NEUROSCIENZE AVANZATE

GUSTO

Interesse biotecnologico dei recettori di gusto e olfatto. Sono le Cenerentole dei sensi, dato che la vista è il senso per eccellenza nell'uomo. Nonostante ciò, si pensa che in realtà a livello sentimentale sia più importante l'udito della vista, poiché si registrano più suicidi tra non udenti che tra non vedenti.
Recettori di senso specifico, la maggior parte localizzati nella testa, retinici (vista), situati a livello epiteliale (gusto e olfatto).

- **Recettori gustativi**: molecole solubili (si sciolgono nella saliva), anche di grandi dimensioni. Percepiti ad alta soglia (servono concentrazioni mM → evolutivamente ha senso perché l'animale si deve impegnare per procacciarsi il cibo, i carboidrati sono fonti energetiche e non ha senso spendersi per prendere qualcosa con poco potenziale energetico; invece l'amaro ha una soglia bassa perché solitamente è nocivo → conviene poterlo percepire a basse concentrazioni).
- **Recettori olfattivi**: molecole liposolubili (si devono sciogliere nel muco, ci sono strategie evolutive che vedremo), e volatili (meno di 300 dalton). Bassa soglia (in realtà vedremo che dipende da cosa odoriamo, ci sono 7 ordini di grandezza di differenza. ad esempio l'odore del terreno bagnato è percepito nel nM perché può fare la differenza tra vita e morte di un animale che si trova in un ambiente la cui disponibilità idrica è limitata).

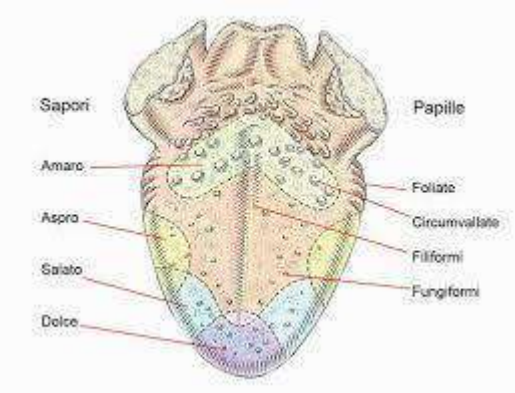
Sono recettori che si **complementano**. Flavour: gusto (taste, le molecole arrivano per via ortonasale) + olfatto (le molecole entrano dalla bocca e risalgono dietro al palato fino a raggiungere l'epitelio olfattivo = via retronasale).

I due stimoli si distinguono perché le vie nervose percorse sono diverse. L'unico senso che non passa per il talamo prima di arrivare alla corteccia è l'olfatto, e questa è una questione anatomica, dato che il bulbo olfattivo è subito sotto la corteccia. Con l'imaging funzionale si vede che ci sono neuroni che rispondono o alla lingua o alla mucosa olfattiva o ad entrambe contemporaneamente (sono in numero ridotto) ed entra in gioco anche la vista (pensiamo ai rapaci: a livello dei collicoli si costruisce una mappa di probabilità di trovare la preda in un certo punto mettendo insieme informazioni visive e di altra natura).

Imaging funzionale con la **PET** (generalmente sovrapposta a immagini di risonanza magnetica nucleare) → è invasiva perché usa radioisotopi, ma è relativamente poco invasiva perché questi hanno tempi di dimezzamento corti (pochi minuti). Si marca il glucosio, ad esempio con F18 → il glucosio marcato va in giro, il neurone lo assume ma lo metabolizza → invece di usare il glucosio si usa il 2-desossiribosio perché viene riconosciuto dai trasportatori del glucosio come se fosse glucosio, e lo stesso per le esochinasi → viene fosforilato in 6 come glucosio e non è più liberamente diffusibile, poi però si ferma con la glicolisi perché non può essere attaccato l'ossidrile in posizione 2 → accumulo radioattività → imaging misurando i raggi gamma emessi dal decadimento degli isotopi radioattivi (emissione di positroni → annichilimento con elettroni → energia, due fotoni gamma a 180° l'uno dall'altro → i computer collegati ai detector, a forma di anelli, sono programmati in modo da registrare solo gli eventi che avvengono contemporaneamente a 180°)
Tecnica potente: il metabolismo di un tumore è molto più elevato di quello di una cellula normale → *in teoria* potremmo identificare i tumori allo stadio di singola cellula → in realtà questo non avviene perché il positrone una volta emesso ha una nuvola di probabilità di incontrare un elettrone nei 5 mm circostanti → tanti positroni emessi da una cellula hanno localizzazioni diverse in cui incontrano un elettrone → ho piani di scansione di 5mm → se attraversano la cellula, la vedo, altrimenti ho la certezza solo quando il tumore supera il mezzo cm → ha un'ottima risoluzione funzionale ma non spaziale → per questo si abbina la risonanza magnetica. Ad esempio se facessi una PET dopo la chemioterapia, non uso un criterio morfologico per capire se questa funziona, ma un criterio funzionale.

I recettori gustativi sono organizzati nelle papille gustative, ma non solo. Oltre che nella bocca, si trovano in tante altre strutture anatomiche (apparato digerente → in generale regolano l'attività endocrina, corteccia, spermatozoi → è possibile aumentarne la motilità usando delle molecole che stimolano i recettori gustativi, bronchi → possibile utilizzo di molecole stimolatorie contro l'asma che non siano l'adrenalina, che ha anche

altri effetti). Da considerare il fatto che alcuni recettori dell'amaro regolano meglio alcuni pathway di altri.



Papille gustative:

1- Filiformi: lingua anteriore, senza recettori, filtrano le particelle abrasive

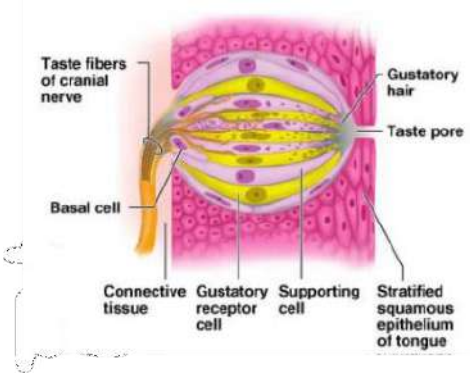
2- Fungiformi: lingua anteriore, mediamente 6 recettori

3- Foliate: lingua posteriore, sui lati posteriormente

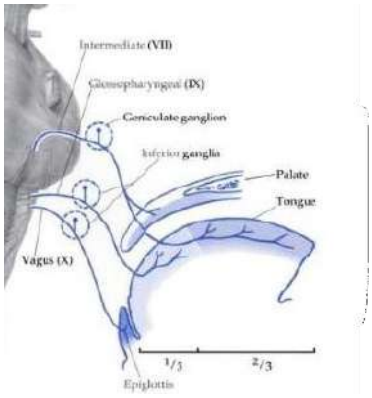
4- Circumvallate: lingua posteriore, davanti al V linguale. I bottoni sono nel vallo

Bottoni gustativi: circa 10 000 nella cavità orale, la maggior parte a livello delle papille, alcuni dispersi.
Un bottone è composto da:

- Cellule di supporto: supporto fisico e metabolico, possiedono ciglia e recettori (ruolo non noto)
- Cellule recettoriali: cellule polarizzate con ciglia e microvilli con recettori nella parte apicale, sinapsi con il neurone primario nella parte basale. Vita media di 1-3 mesi.
- Cellule basali: staminali adulte



Rilevanza dell'organizzazione anatomica dei bottoni: essi sporgono da un piccolo buchetto protettivo , e non sporgono sulla punta della papilla, ma si trovano ai lati, non a diretto contatto con saliva e cibo (che crea abrasioni) cioè dove la saliva può arrivare ma le particelle di cibo no.



3 paia di nervi cranici:

- Nervo intermedio (VII paio): lingua anteriore e palato
- Nervo glosso faringeo (IX paio): lingua posteriore e faringe
- Nervo vago (X paio): epiglottide e laringe

Poi neuroni del tratto solitario → talamo → lobo frontale/insula
Non sono state trovate connessioni anatomiche tra questi nervi (nucleo solitario) e il nucleo conatogeno. Il vomito sarebbe l'ultima difesa indotta dall'organismo per evitare di ingerire una sostanza amara e potenzialmente tossica.

Dalla corteccia frontale → amigdala →→ i sapori evocano emozioni, memorie etc
Il sistema è complesso e anche ancora poco conosciuto. Ci sono due modelli che spiegano la distinzione di sapori diversi:

1) **Linea marcata**: la percezione di un particolare sapore attiva una singola via, ognuna indipendente dall'altra (questo è ciò che abbiamo per l'udito nell'Organo del Corti).
2) **Vie crociate**: la stimolazione differenziale di un numero limitato di neuroni (popolazione) permette di differenziare la stimolazione (olfatto è così).

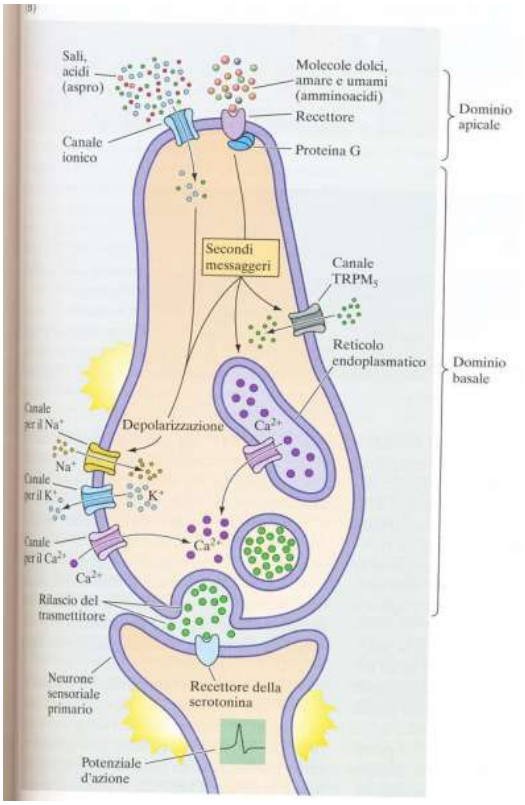
Fisiologia della percezione del Flavour: A livello della corteccia orbitale frontale OFC si ha integrazione di stimoli gustativi e olfattivi, ma anche visivi e altre sensazioni. L'integrazione è permessa da neuroni bimodali, che rispondono a stimolazioni di natura diversa. Ad esempio, la percezione della consistenza può rendere più o meno appetibile lo stesso alimento.

Percezioni gustative:

1- Salato (Sali inorganici) - ionotropici 2- Acido (H+) - ionotropici
3- Dolce (zuccheri, alcol, alcuni aminoacidi, alcuni sali metallici) - metabotropici
4- Amaro (alcaloidi e altro, spesso vegetali) - metabotropici
5- Umami (glutammato di sodio = carne) - metabotropici (stessa famiglia dei recettori del dolce)

Le review più recenti parlano anche della percezione degli acidi grassi. Se diamo un gelato ad un gatto, apprezza molto. Ma i gatti non hanno la percezione del dolce (hanno perso il gene) → è quella per gli acidi grassi che si attiva. Da un punto di vista energetico anche quella è utile → gli acidi grassi sono una fonte migliore.
Premio Nobel di 2021 → la capsaicina si riteneva percepita a livello gustativo, invece stimola recettori termici.
Bevande gassate tramite CO_2 (argomento che poi però si è sgonfiato).

La disposizione dei recettori sulla lingua (dolce/salato in punta, acido ai lati, amaro in fondo), sembra evolutivamente logica (un animale prova a sentire il gusto con la punta della lingua e verifica il contenuto di sostanze utili, se si liberano ioni H^+ allora si continua, ma se si sente amaro alla fine si sputa), ma in realtà tutte le zone sono sensibili a tutto.



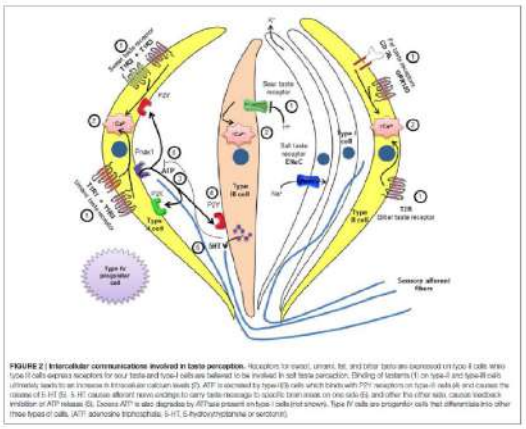
Qualità (gusto fondamentale)	Sostanza percepibile	Concentrazione (espressa in mol/l)
Dolce	Glucosio	10^{-1}
	Saccarosio	10^{-2}
	Saccarina	10^{-5}
Acido	HCl e altri acidi	10^{-3}
Salato	NaCl e altri sali	10^{-2}
Amaro	Caffeina	10^{-3}
	Chinino	10^{-5}
	Stricnina	10^{-6}

La stricnina è un veleno per gli animali.

I recettori sono legati tra loro tramite tight junctions → la via paracellulare è impedita e lo stimolo deve per forza arrivare ai recettori sulla membrana apicale.
Attivazione dei recettori → trasduzione accoppiata a proteine G → aumento del [Ca++] intracellulare → rilascio delle vescicole con Nt (serotonina, ma anche noradrenalina e GABA) → neurone sensoriale primario.
La modalità di contatto tra la cellula recettoriale e il neurone primario non è unica.
Quella nell'immagine è una cellula archetipica. innanzitutto perché recettori per modalità sensoriali diverse non localizzano sulla stessa cellula.

La distinzione tra cellule di supporto e recettoriali è superata (non sono solo di supporto, ma possiedono anche recettori per il salato, canali Enac del trasporto del tubulo contorto distale, sensibili all'aldosterone):

Cellule di tipo II: recettori metabotropici, stretto contatto con la fibra primaria, non possiedono canali del Ca o vescicole con Nt ma liberano ATP. L'ATP è percepito dai recettori purinergici P2X sulla fibra primaria e P2Y sulle cellule di tipo III.
Cellule di tipo I: non sono in contatto diretto con la fibra primaria, possiedono gli enzimi per la rimozione dell'ATP dall'ambiente extracellulare (supporto metabolico) e canali al sodio ENAC (percezione gustativa del salato)
Cellule di tipo III: recettori ionotropici per l'acido e recettori P2Y per l'ATP (possono essere modulate dalle tipo II), apparato sinaptico classico con la fibra (sfruttano Nt), sono le uniche ad avere questa modalità con l'apparato vescicolare.
Un topo knock-out per P2X non percepisce più alcun gusto => l'ATP è necessario per la percezione gustativa



Murtaza et al., 2017

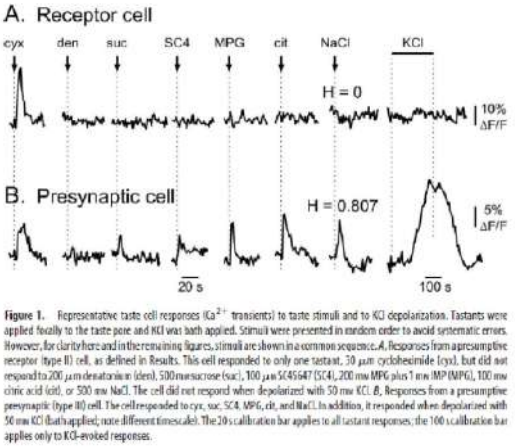
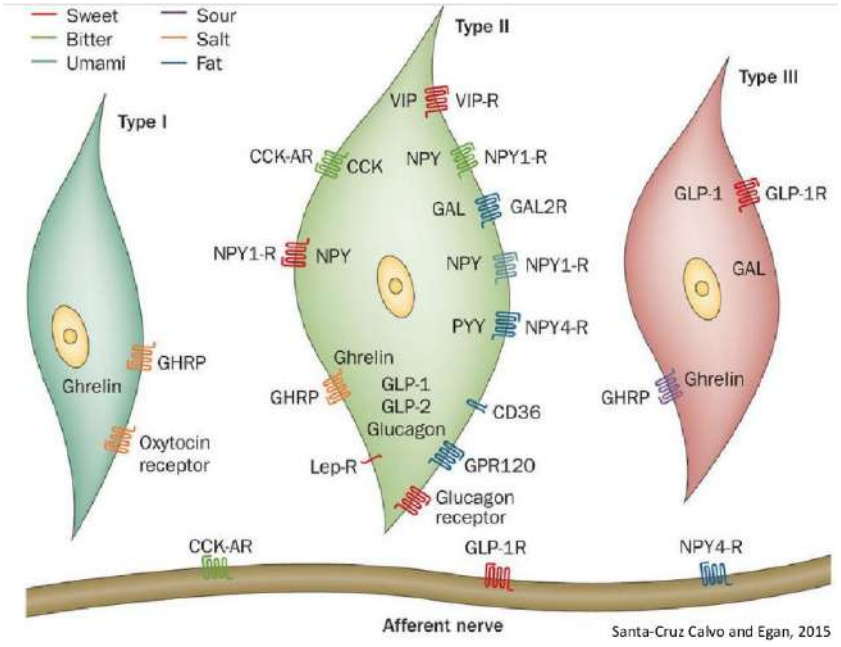


Figure 1. Representative taste cell responses (Ca^{2+} transients) to taste stimuli and to KCl depolarization. Tastants were applied focally to the taste pore and KCl was bath applied. Stimuli were presented in random order to avoid systematic errors. However, for clarity here and in the remaining figures, stimuli are shown in a common sequence. *A*, Responses from a presumptive receptor (type II) cell, as defined in Results. This cell responded to only one tastant, 10 μm cycloheximide (cyx), but did not respond to 200 μm denatonium (den), 500 mM sucrose (suc), 100 μM SC45647 (SC4), 200 mM MPG plus 1 mM IMP (MPG), 100 mM citric acid (cit), or 500 mM NaCl. The cell did not respond when depolarized with 50 mM KCl. *B*, Responses from a presumptive presynaptic (type III) cell. The cell responded to cyx, suc, SC4, MPG, cit, and NaCl. In addition, it responded when depolarized with 50 mM KCl (bath applied; note different timescale). The 20 s calibration bar applies to all tastant responses; the 100 s calibration bar applies only to KCl-evoked responses.

I recettori metabotropici attivano vie simili che portano al rilascio di ATP, che esce dalla cellula con i canali pannexina. l'ATP modula l'attività delle cellule di tipo II, III e anche del neurone primario.

Se prendo una cellula di tipo II e una di tipo III, la prima non ha i canali del Ca voltaggio dipendenti e dell'apparato di secrezione vescicolare. Se misuriamo la fluorescenza di una cellula che rilascia il Nt in modo Ca dipendente (inserisco nella cellula o con microniezione o aumentando la permeabilità di membrana un ligando del Ca che fluoresce in presenza di Ca: scelta classica = Aequorina). In un mezzo ricco di KCl per una cellula di tipo II non vedo fluorescenza, mentre se controllo con un neurone primario invece sì. So anche vedere che ci sono vari stimoli che si possono percepire (25 tipi di amaro con altrettante cellule). Si vede che la cellula di tipo II è molto selettiva nella sua risposta agli stimoli. Ad esempio la cellula di tipo III lo è meno perché risponde anche all'ATP.



Santa-Cruz Calvo and Egan, 2015

L'effetto di convergenza di input sulle cellule di tipo III (presinaptiche), mentre le II hanno una sensibilità ad un particolare stimolo (amaro/dolce/umami, e non rispondono a tutti i tipi di amaro ma a quelli che sono in grado di attivare quel particolare sottotipo recettoriale), al contrario le III sono sensibili ad una platea molto più ampia di stimoli perché sono una sorta di via comune generale e finale di tutte le cellule recettoriali. Non si tratta semplicemente di un meccanismo di trasmissione sinaptica più complicato (quella classica delle cellule presinaptiche), la possiamo immaginare più complessa immaginando che le II attivano le III che attivano le I; ma in realtà è più complesso perché l'ATP delle II può stimolare direttamente le I. È effettivamente un sistema molto complesso, e anche per questo ha ancora punti oscuri. Inoltre, non è soltanto complesso, ma anche altamente sensibile ad ormoni che in massima parte sono regolatori del metabolismo glucidico.

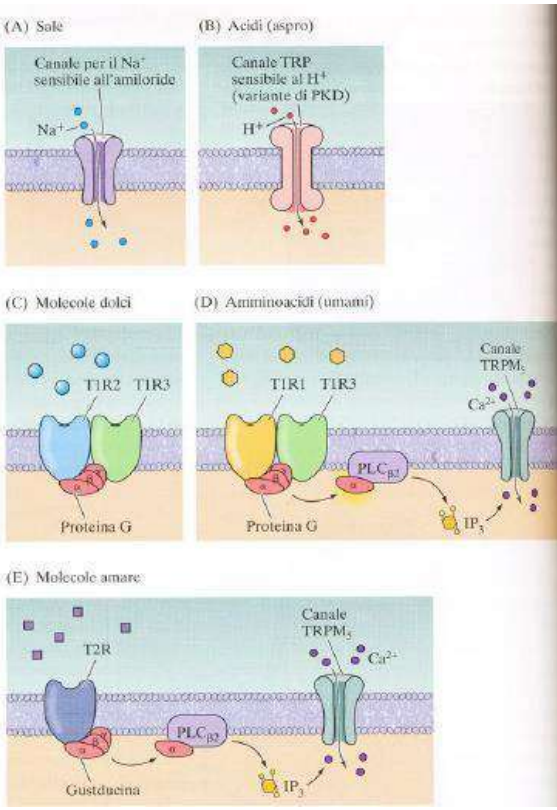
Come viene trasdotto il segnale

SALATO. Il canale ENAC: ingresso di sodio → depolarizzazione di membrana → apertura famiglia TRPM (mediano i potenziali transitori di membrana) → depolarizzazione aumentata → canali calcio → vescicole Nt.

ACIDO. Sono basati su canali al K+, aperti se [H+] basso → cellula iperpolarizzata, chiusi se [H+] alto →

cellula depolarizzata. (Non canali direttamente per H^+, per evitare acidificazione del citoplasma)

- Canali pH dipendenti (H+ entra nella cellula) + canali al K+ sensibili agli H+ intracellulari
- Canali al K+ sensibili agli H+ extracellulari (H+ non entra nella cellula)



DOLCE e UMAMI. Recettori T1R in forma dimerica. T1R1-T1R3 per umami, T1R2-T1R3 per dolce. Questi recettori sono associati ad una proteina G stimolatoria. (I felini non possiedono T1R2, non percepiscono il dolce per questo)

La proteina G eterotrimerica responsabile della percezione di dolce e amaro è la **gustducina**. Quando arriva il ligando alfa scambia GDP con GTP e si attiva, attiva l'adenilato ciclasi e poi idrolizza il GTP, inattivandosi. L'adenilato ciclasi converte ATP ad AMP ciclico (amplificazione del segnale), che attiva la chinasi PKA. Le subunità alfa e beta agiscono su altre vie. Ci sono vari processi per bloccare tempestivamente il segnale.

AMARO. **Recettori T2R**, nell'uomo (TAS2R) sono 25 (molto importante, discriminazione tra effetto tossico e farmacologico). In questo caso dopo il distacco della subinità alfa, non è questa che media la trasduzione, ma le subunità beta e gamma della gustducina attivano la via della fosfolipasi C beta2 (→ produzione di diacilglicerolo e inositolo trifosfato → apertura dei canali Ca++ intracellulari → apertura dei canali TRPM5 → ingresso di sodio per ulteriore depolarizzazione), nel frattempo la subunità alfa attiva una fosfodiesterasi che consuma l'AMP ciclico. Effetto: depolarizzazione → apertura dei canali al Na+ voltaggio dipendenti → apertura dei canali pannexina → fuoriuscita di ATP. Quindi la via principale in ultima battuta fa fuoriuscire ATP che può essere modulatorio per III e I (lo degradano) e neuroni primari . Ruolo della PKA: fosforila la fosfolipasi C beta 2, che è meno attiva fosforilata → quindi da questo punto di vista la G alfa contrasta l'attività della PKA aumentando quella della fosfolipasi C beta 2.

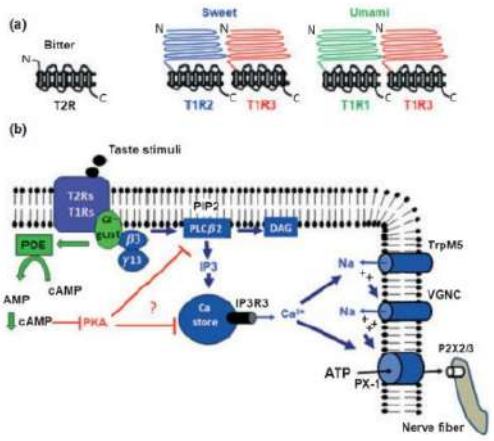


Figure 2 Diagrammatic representation of taste GPCRs (a) and downstream signaling effectors (b). Receptor binding leads to Gβγ activation of PLCβ2, production of IP_3, release of Ca^{2+} from intracellular stores, Ca^{2+}-dependent activation of TrpM5, depolarization, activation of voltage-gated Na^+ channels (VGNC) and release of ATP through pannexin-1 hemichannels. The released ATP activates purinergic receptors on afferent nerve fibres. Alpha gustducin tonically regulates cAMP levels via activation of a phosphodiesterase (PDE), which subsequently prevents phosphorylation and desensitization of Ca^{2+} signalling effectors.

Esperimento di percezione del gusto: due biberon, uno con acqua normale, uno con acqua insaporita a concentrazioni crescenti (NB: all'aumentare della concentrazione, il topo wt preferisce dolce e umami, evita l'amaro). **Topi KO** per il canale TRPM5 non percepiscono dolce, umami, né amaro (non si rilevano preferenze). Stesso risultato per i KO della fosfolipasi C beta2. => TRMP5 e PLC beta2 sono fondamentali per la percezione di dolce, umami e amaro. Sfruttando un costrutto particolare (verosimilmente usando dei promotori specifici solo per le cellule con recettori dell'amaro) si può reintrodurre PLC beta2 in maniera

selettiva (knock-in selettivo per recupero di funzione), solo nelle cellule che possiedono un recettore T2R per l'amaro → il topo recupera la percezione dell'amaro, ma non del dolce e dell'umami. => Una cellula possiede una sola modalità gustativa.

Nobel 2021: recettori del tatto e della capsaicina. Canali TRP (il TRPM5 è coinvolto nella percezione di dolce/amaro/umami ed è uno dei 30 membri circa della famiglia). La capsaicina è in grado di attivare direttamente questi recettori (come altri alimenti vegetali. mentolo, menta, aglio…) senza passare per un altro recettore prima. Alcuni agiscono come recettori di pressione osmotica, stiramento, vibrazione.

La **capsaicina** si lega ai recettori TRPV1, che sono termosensibili (si attivano oltre i 40°C), sensibili al pH, e infine alla capsaicina → si aprono, fanno entrare sodio, calcio, idrogeno → in particolare al calcio, che è in grado di legare la calmodulina, che modula a sua volta l'apertura dei canali stessi. Effetti della capsaicina su questi canali. La percezione bruciante del piccante è legata al fatto che il canale è termosensibile, poi una serie di altri effetti:

- attivazione lipolisi (riduzione accumulo acidi grassi e quindi formazione del fegato grasso), tramite LRP1 (HDL-LDL) riduzione attività delle cellule schiumose responsabili degli ateromi quindi rischio ridotto di aterosclerosi
- aumento dell'attività della isoforma endoteliale della ossido nitrico sintasi (3 isoforme, endoteliale, neuronale e sono costitutive nei tipi cellulari in cui si esprimono, che non sono limitati ai distretti in cui sono state trovate e che hanno dato loro il nome, inducibile; la inducibile viene indotta in casi ad esempio di infiammazione, questa tende a produrre ossido nitrico in concentrazioni mM, a differenza delle altre che tendono al uM. uM → vascolarizzazione aumentata, effetto rilassante quindi contrasta l'ipertensione)
- stimola la produzione di proteine 1 e 2 che favoriscono il disaccoppiamento mitocondriale tra trasporto elettronico e la produzione di ATP a favore della produzione di calore → si producono grassi
- nel pancreas produzione di insulina → riduzione rischio diabete
- riduzione adipogenesi → riduzione obesità

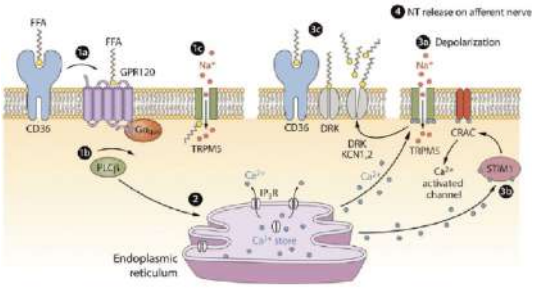
→→ mettendo tutto insieme si potrebbe avere una riduzione del rischio di malattie cardiometaboliche. Questi sono studi in vitro in cellule transfettate, ci sono anche studi in vivo, anche nell'uomo si conducono facilmente visto che i recettori che si stimolano sono sulla lingua.

La percezione olfattiva tende ad aumentare fino ai 20 anni, poi già dai 30 comincia a diminuire (in realtà come tutti i tipi di percezione). Ci sono anche educazioni alimentari.

ACIDI GRASSI. Cellule di tipo II (di solito la cosa difficile è individuare il recettore e la via per le II). Il CD36 è una traslocasi per gli acidi grassi, serve una traslocazione per quelli oltre i 10-12 atomi di C. Non è associata a cotrasporti di ioni, non è un GPCR. Un recettore che era orfano invece sì, il GPR120. Possibili meccanismi per la traslocasi (Reed and Xia, 2015:

1) Una volta che cambia forma per la traslocazione, interagisce con GPR120 determinando o partecipando all'attivazione quando è anche legato un acido grasso
2) Con un meccanismo sconosciuto interagisce direttamente con la gustducina.

Ci sono comunque altri GPCR che si pensa possano essere coinvolti nella percezione.



Recettori per l'amaro (famiglia TAS2R): Ci sono anche una serie di pseudogeni (ψ) in questa famiglia. Ci sono alcuni ligandi che stimolano più recettori, come la caffeina (46,14,9,10) e dovrebbero esserci alcuni ligandi associati almeno ad ognuno dei recettori. German Institute of Human Nutrition individuano il legame recettore-ligando (sono progetti finanziati dall'industria, per cui si cerca prima di ottenere il brevetto piuttosto che la pubblicazione perché altrimenti si rischia di perdere il brevetto delle applicazioni dello studio → *potrebbe essere interessante vedere gli start up days career days unipi*).

Non c'è corrispondenza biunivoca con il ligando, tutti sono GPCR, possiedono 7 domini transmembrana con una sequenza consenso di glicosilazione (nel 2° loop extracellulare, tra TM4 e TM5), se questa sequenza viene modificata si ha la trascrizione del gene ma poi le vescicole che lo contengono non vengono inserite in membrana. Molti geni in cluster sul chr 12, alcuni sul chr 7, uno sul chr 5. C'è elevata presenza di SNPs, che genera alta variabilità infatti ci sono decine di varianti per SNPs per ogni recettore, e non è detto che queste intacchino la funzione (mutazioni silenti) ma potrebbero dare differenze di espressione → alcune sequenze interne al gene potrebbero dare informazioni sulla regolazione dell'espressione genica; se si hanno mutazioni sinonime potrebbero aversi comunque le stesse prestazioni funzionali, oppure si possono avere mutazioni che danno perdita di funzione o un guadagno di funzione (quell'alimento diventa estremamente amaro e spiacevole); con un sequenziamento scopriremmo che ci sono più varianti che sequenze non mutate.

Il **gene hTAS2R38** codifica per il recettore 38 ed è coinvolto nella percezione del sapore della feniltiocarbammide PTC. Il gene possiede 3 SNPs (49 **P**ro/**A**la, 262 **A**la/**V**al, 295 **V**al/**I**le) indipendenti (infatti ci sono anche tutte le altre combinazioni ma sono rare rispetto a queste due), che generano due alleli principali: **PAV** taster e **AVI** non taster → PAV PAV super-taster, PAV-AVI taster, AVI-AVI non taster. Si conducono test psico-fisici per capire qual è la percezione che non hanno gli AVI (se sentono poco amaro ma lo sentono è perché magari si attiva anche un altro recettore), i numeri negli istogrammi sono il voto che viene chiesto al soggetto testato ad ogni concentrazione. Il recettore 38 è coinvolto nella percezione dell'amarezza dei glucosinolati, che vengono convertiti in isotiocianati. C'è una causa genetica dell'alcolismo? L'ipotesi di correlazione tra sensibilità all'amaro e alcolismo non è mai stata provata. I non taster sono più spesso fumatori e bevitori (c'è un'associazione tra fumo e consumo di alcol con la mancata percezione dell'amaro, e la tendenza si inverte nel caso di taster). I vini rossi sono apparentemente più preferiti nei maschi che nelle femmine, ma questa differenza di genere si appiattisce quando si guardano i non taster.

Il **gene hTAS2R16** codifica per il recettore 16, coinvolto nella percezione dei glicosidi cianogenici, piranosidi, tra cui la salicina. I glucopiranosidi, una volta metabolizzati, liberano cianuro. La sostituzione aa 172 Lys → Asn ha determinato un aumento della sensibilità, che è vantaggioso. Ci aspetteremmo che la variante prenda il sopravvento. Nelle zone in cui la malaria è endemica invece resiste l'allele meno sensibile. L'eterozigote ingerisce abbastanza glucopiranosidi da uccidere il plasmodio, ma non tanti da essere intossicato (il vantaggio sta nella tossicità contro il plasmodio ma non l'ospite).

Dal punto di vista sperimentale, come verifichiamo in laboratorio la corrispondenza recettore-ligando?

Esperimento per capire la corrispondenza recettore-ligando e per la quantificazione della percezione gustativa: si prendono delle **cellule renali embrionali HEK**, HEK293T che contengono tutti i componenti per la trasduzione del segnale dell'amaro (catena di trasduzione delle proteine G), tranne due cose: non esprimono recettori né alfa-gustducina. Vengono ingegnerizzate prima in modo da esprimere stabilmente **una chimera della gustducina** (non hanno l'alfa-gustducina ma hanno altre isoforme di subunità alfa delle proteine G)**.** Successivamente sono trasfettate con un plasmide in modo da esprimere in maniera transitoria un **recettore gustativo**. Se il recettore viene stimolato correttamente, il signalling risulta in un aumento di Ca++ intracellulare. Il Ca++ lega molecole che emettono fluorescenza (fluorofori, registrata sotto ogni pozzetto da un diodo), che viene rilevata con il FLIPR (fluorimetric imaging plate reader, a 96 pozzetti). Si usano concentrazioni crescenti del ligando per quantificare la risposta, fino al raggiungimento del plateau. Per ogni esperimento servono circa 5 minuti (efficienza molto più alta che con una singola telecamera). Il fatto che servano così tanti pozzetti (esperimenti) deriva dalla necessità di avere varie concentrazioni (se risponde a basse concentrazioni e non ad alte allora era un falso), diversi controlli, oltre che diversi ligandi.

Controllo positivo: usando un ligando noto, questo deve dare fluorescenza. Controlli negativi: HEK non trasformate o trasformate con plasmide vuoto. Per controllare che il segnale sia effettivamente dovuto all'aumento della concentrazione di Ca++ causata dal legame recettore-ligando, si esegue un secondo controllo: si usa un secondo ligando, di natura completamente diversa (somatostatina, noradrenalina). Questo dovrebbe legare altri recettori e attivare il segnale attraverso un'altra via. Un picco casuale è possibile, due consecutivi con due stimoli diversi sono molto improbabili. Si esegue questo esperimento per **estrapolare una curva dose-effetto e calcolare l'EC50** (più è bassa, maggiore è l'affinità, migliore è il ligando). Molti ligandi amari non sono abbastanza idrofili da sciogliersi a concentrazioni tali da saturare il recettore, quindi non si ottengono sempre sigmoidi perfette.

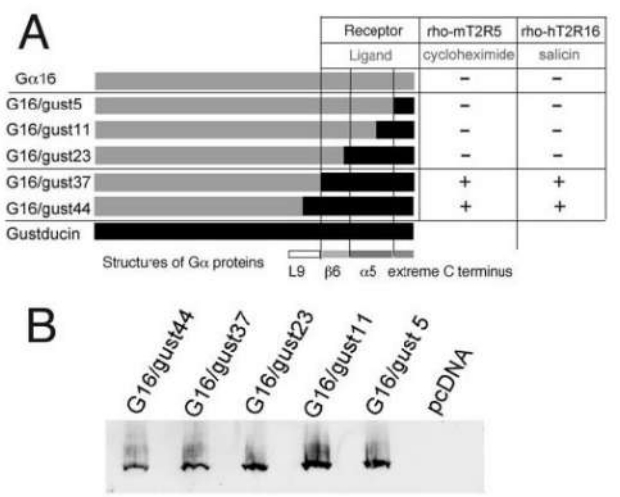


Figure 2. *A*, Schematic illustrations of chimeric G16/gust proteins with different lengths of C terminal amino acids found in gustducin and their abilities to couple to T2Rs. +, Specifically responded to the ligand in dose-dependent manner; −, did not exhibit any responses. *B*, Immunoblot analysis of FLAG-tagged chimeric G16/gust subunits expressed in HEK293T cells, stained with the anti-FLAG M2 monoclonal antibody. The FLAG epitope tag did not influence the functional activity of G16/gust chimeras.

Come è stata creata **la chimera della gustducina?** Le HEK esprimono varie proteine G, con vari tipi di subunità alfa, ma non la subunità alfa della gustducina. Per saggiare l'efficacia del sistema si è usato il recettore, la Galfa16 e il rispettivo ligando. Topi KO per la gustducina non perdono completamente la sensibilità al dolce e all'amaro
=> ci sono altre proteine G in grado di interagire parzialmente con i recettori gustativi. Sono state eseguite alcune mutazioni al C-terminale della subunità G alfa, al fine di aumentare l'interazione con i recettori gustativi: sostituzione di 44 aa al C-terminale con 44 aa di altre proteine G presenti nelle molecole gustative. Alcune chimere permettono di rilevare una risposta.
Cioè questi ricercatori hanno verificato la risposta al segnale con la Galfa16, che è nulla, allora hanno cominciato a sostituire la parte finale, a diversa altezza, con la parte finale della gustducina, per permetterne il legame → sostituendo gli ultimi 44 aa, si ha risposta. Quindi decidono di usare la chimera G16/gust44. Controlli: prendono isoproterenolo, il controllo lo fanno prima, è un ligando dei beta2 adrenergici, quindi vedono che effettivamente queste cellule rispondono ad uno stimolo non gustativo associato a liberazione di calcio, poi le stimolano con concentrazioni crescenti di cicloesimide (per il topo, salicina nel caso del recettore umano) per cui le cellule cominciano a rispondere oltre una certa soglia di concentrazione → si fermano quando l'area del picco non cambia più (plateau), e riportando le aree in un grafico si ottengono curve sigmoidi (non sempre si ottengono perché i soluti non sono abbastanza solubili e non saturano il recettore). Altro controllo: applicano il propiltiouracile, ligando per il recettore 38 e non 14, infatti non ottengono risposta. Fanno anche un'altra cosa: è l'alfa gustducina l'unica subunità che è in grado di attivare la trasduzione a valle? In realtà no, nelle cellule gustative è la più rappresentata, ma se provano a fare chimere con i 44 di altre subunità G, vedono che effettivamente alcune sono in grado di avere funzionalità, ad esempio G16/t244 risponde. Infatti se faccio un KO di alfa gustducina, ottengo un peggioramento ma non una scomparsa della capacità di percepire l'amaro.

Controllo dell'espressione del gene e dell'esposizione del recettore Gs16 a livello di membrana. La visualizzazione si realizza tramite immunoistochimica grazie ad tag con un piccolo epitopo di herpes simplex virus (il tag serve perché non vogliamo cross-reazioni con gli altri 24 membri della stessa famiglia recettoriale), per cui abbiamo un anticorpo. Un altro anticorpo lega ed evidenzia la membrana. La sequenza del recettore 3 della somatostatina, nota per favorirne l'esposizione in membrana, viene usata per localizzarlo in membrana, quindi il costrutto finale è pro→SST3–TAS2R–HSV. Non solo, è noto che ci sono delle proteine ausiliarie chaperon-like che facilitano la fusione delle vescicole con la membrana target, ad esempio RTP e REEEP come famiglie. Si vede che se si esprime la chimera taggata solo con HSV allora non si ha risposta, ma questa si ha quando si aggiunge SST3 (Behrens et al., 2006). Lo stesso costrutto, espresso con queste chaperonine, a seconda del recettore, reagiscono in modo favorevole. Quindi è un sistema molto

complesso in cui non basta far esprimere il recettore → L'efficienza di trasfezione è bassa (25% per il recettore 16) e l'espressione è a livello citoplasmatico. Si aggiunge al 5' l'epitopo del recettore 3 della somatostatina SR3, che aumenta l'espressione a livello di membrana. Per aumentare l'efficienza di espressione a livello della membrana si può sfruttare:

1) Dimerizzazione del recettore a livello membranale
2) Co-espressione di proteine accessorie di traffico vescicolare e chaperonine
3) Presenza di motivi coinvolti nell'export (export motifs) e nella localizzazione delle proteine (glycosylation motifs)
   Importanza della glicosilazione: sul 2° loop transmembrana dei recettori c'è una **sequenza conservata** contenente arginina-serina-treonina. Sfruttando la tunicamicina (antibiotico) o tramite mutagenesi sito-specifica si può ridurre / inibire la glicosilazione. Quindi in realtà si ha lo stesso effetto, che si osserva valutando il peso molecolare del recettore. Dal punto di vista funzionale, la glicosilazione è rilevante? Sì perché usando il FLIPR si vede che l'area del picco diminuisce nei recettori non glicosilati. Recettori poco/non glicosilati sono meno sensibili/non rispondono allo stimolo. Approccio critico al paper: se sto usando un western blot per quantificare il peso molecolare della mia proteina, e so che gli anticorpi che uso hanno anche target aspecifici potenzialmente, come faccio ad essere sicura che la differenza di peso derivi dalla mancata glicosilazione? Per esempio usare un metodo di colorazione degli zuccheri sul blot, che dovrebbe comparire solo nelle bande a peso molecolare maggiore. Inoltre, un altro controllo da fare è vedere la localizzazione di membrana con e senza glicosilazione. L'espressione avviene perché si vede nel western blot. Questo serve a separare l'ipotesi che la glicosilazione sia coinvolta nel legame con il ligando da quella che sia legata all'espressione in membrana. Gli autori non l'hanno fatto ma andrebbe controllato.

Tipizzazione delle varianti alleliche di un recettore e quantificazione della sensibilità:

1- Si prende un panel di assaggiatori che risponde in maniera diversa ad una serie di molecole
2- Estrazione del DNA (tampone salivare)
3- Amplificazione dei geni dei recettori (primer esterni al 5' e al 3', non troppo vicini, non troppo lontani, per massimizzare la bontà della lettura). I geni dei recettori sono abbastanza brevi, quindi non ci sono problemi. Si procede alla purificazione e al sequenziamento.
4- Identificazione delle varianti alleliche, se sono mutazioni sinonime o varianti aminoacidiche. Gli aplotipi in cui si hanno sostituzioni aa rilevanti potrebbero essere quelli con sensibilità aumentata o diminuita.
5- Si mette in relazione l'aplotipo con la sensibilità dichiarata dall'assaggiatore, per valutare una correlazione.
6- Si crea una libreria con i vari aplotipi. Si genera un costrutto sfruttando una error prone PCR per inserire siti di restrizione, si aggiungono il tag HSV al 3' e SR3 al 5'. Il plasmide viene inserito in E.coli e amplificato. Si opera la selezione con antibiotico e il controllo della ligazione (restrizione + corsa elettroforetica).
7- Trasfezione del sistema HEK con i plasmidi contenenti gli aplotipi di interesse. Si controlla l'espressione del recettore a livello della membrana: la mancata esposizione del recettore potrebbe essere la causa della riduzione di sensibilità.
8- Saggio funzionale con il trans-isocoumulone per valutare l'EC50. Si identificano le varianti alleliche che rispondono diversamente dal wt.
   Vedi il caso specifico: un aplotipo GTT del recettore 1 che non viene espresso in membrana→ l'individuo percepisce il trans-isocoumulone solo con il recettore 14, che è ad alta soglia

OLFATTO

L'uomo percepisce 10 000 – 100 000 molecole diverse, tutte **volatili** (peso inferiore a 300 dalton). I recettori sono normalmente a **bassa soglia**, ma la soglia varia (a seconda della molecola) di 6 unità logaritmiche. L'olfatto ha altissima capacità discriminativa (anche tra molecole chimicamente vicinissime).

I recettori olfattivi sono neuroni che vengono continuamente rigenerati (emivita 2-3 mesi). È un sistema molto fine in cui la rigenerazione parte da staminali che presentano esattamente il recettore perso dal neurone da rigenerare → studiato per comprendere la regolazione della sostituzione. Ne esistono oltre mille tipi diversi. L'1% dei geni nel genoma umano codifica per recettori olfattivi (2/3 sono pseudogeni), sono localizzati in cluster su quasi tutti i cromosomi, soprattutto sul chr 11. (La percentuale dà idea dell'importanza del determinato senso nella scala evolutiva).

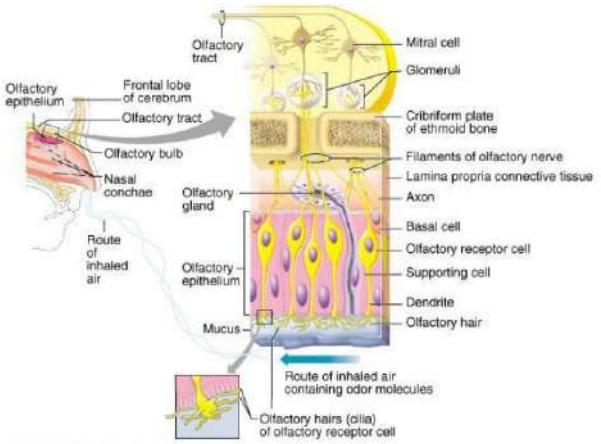
L'olfatto è un senso fondamentale per gli animali, mentre nell'uomo ormai ha quasi esclusivamente aspetto edonistico. Gli animali percepiscono i **feromoni** tramite recettori diversi da quelli olfattivi, ma strutturalmente analoghi, che funzionano in maniera simile. La percezione dei feromoni influenza il comportamento (sessuale, parentale, aggressivo, caccia, paura…). Sono segnali di riconoscimento specifico, individuale, di gruppo, di marcatura del territorio, di dominanza sociale… Ad esempio negli opossum il maschio dominante copre con il suo odore tutti i membri del gruppo, oppure il gattino che nasce cieco si dirige verso le mammelle della mamma, i lemuri marcano il territorio con le urine, nei primati non umani alcune informazioni sono scambiate con mimica facciale, e possono essere integrati con feromoni, negli elefanti c'è una ghiandola posta sul lobo temporale che produce il suo secreto quando la femmina è pronta all'accoppiamento. Queste molecole si trovano nelle urine, nelle feci, o sono prodotte da ghiandole particolari. L'organo deputato alla percezione di feromoni è l'organo vomero-nasale, che è assente nell'uomo. E' una struttura tubulare innervata, localizzata nella cavità nasale, i cui nervi proiettano al bulbo olfattivo. In certi casi si osservano strutture che potrebbero assomigliare a quest'organo, e ci sono evidenze pseudo- scientifiche secondo cui l'uomo sia in grado di percepire i feromoni. Un esempio di percezione nel topo: una femmina dominante produce segnali chimici che bloccano l'estro nelle altre; oppure, un secreto proteico vaginale del criceto dorato induce una risposta del maschio ad accoppiarsi. Nell'uomo l'organo vomeronasale è considerato vestigiale, manca il bulbo olfattivo accessorio, quindi manca una proiezione neuronale.

Nella maggior parte dei casi l'odore di qualcosa è una combinazione complessa di tanti elementi volatili, raramente da una sola molecola (esempi: peperone verde, porcini, garofano, limone). La percezione di un odore è influenzata anche dalla concentrazione delle molecole e dal contesto (l'acido isovalerico è lo stesso del gorgonzola e dei vestiti sportivi sudati). Quanti odori siamo in grado di discriminare? La varietà del linguaggio, negli aggettivi che descrivono gli odori, rispecchia la nostra capacità di discriminare odori diversi e categorizzarli.

Nei pesci l'olfatto funziona grazie alla percezione di molecole solubili in acqua, come gli aa. Il **molide** (acque dolci del Nord America) ha sviluppato due diversi polimorfismi in seguito alla grande competizione della stagione degli accoppiamenti: il **maschio parentale** (sessualmente maturo a 7 anni, crea il nido, quando la femmina ci entra e depone le uova, lui le cosparge con il suo sperma, accudisce la prole fino all'indipendenza dei figli, e spende molta energia per 10 giorni di cure, in cui non mangia, quando finisce il tempo di cura, si sposta in altre acque per mangiare e se non è ancora finita la stagione crea un nuovo nido, e così via) e il **maschio cornificatore** (sessualmente maturo a 2-3 anni, si aggira intorno al nido di un maschio parentale, e cosparge le uova con il proprio sperma prima che il maschio parentale possa farlo). Il maschio sneaker giovane è distinguibile dalla femmina, quindi deve agire da "sneaker". Lo sneaker adulto "satellite" è indistinguibile dalla femmina, quindi può infilarsi indisturbato nel nido del maschio parentale. Se il maschio parentale sospetta che le uova non siano sue riduce le cure parentali, se si rende conto che i figli sono suoi riprende le cure parentali, altrimenti li abbandona. Il task è olfattivo, il maschio può tornare indietro se si accorge che i figli sono davvero suoi. Dimostrazioni: la performace visiva serve a riconoscere il maschio dalla femmina.

Esperimento 1: (controllo) maschio parentale da solo → quando le uova si schiudono sa che sono sue e quindi dà le normali cure parentali / maschio parentale circondato da maschi cornificatori riconoscibili → Il maschio riduce le cure parentali riconoscendo gli sneaker, ma poi alla schiusa, con metodi olfattivi, si accorge che la prole è sua, quindi riprende le cure
Esperimento 2: (controllo) uova lavate con acqua e rimesse nel nido → stesse cure parentali fornite alla schiusa / uova sostituite con quelle fecondate da altri maschi → il maschio accudisce le uova, ma al momento della schiusa riconosce i figli come non suoi, quindi li abbandona.
Questi studi quindi suggeriscono che non si tratta di una performance visiva (si suppone una olfattiva).

I neuroni olfattivi sono **neuroni bipolari**.



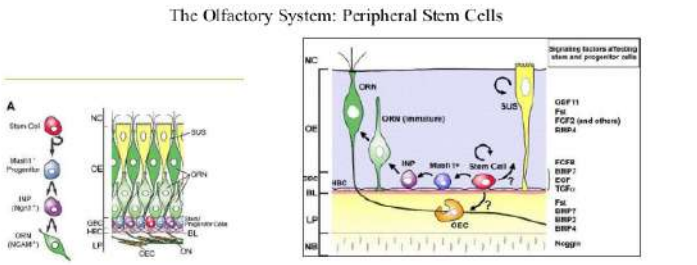
- Il corpo è localizzato nell'epitelio olfattivo
- Il dendrite proietta delle ciglia nella cavità nasale, creando uno strato detto olfactory hair, coperto da uno strato di muco.
- L'assone attraversa la lamina cribrosa dell'osso etmoide e proietta nel bulbo olfattivo, dove avviene la sinapsi tra neurone sensoriale primario e secondario (neuroni mitrali) → alla corteccia piriforme senza passare con il talamo, il quale riceve dopo le informazioni olfattive, elaborate dalla corteccia

La mucosa olfattiva presenta cilia olfattive sui dendriti dei neuroni bipolari, data la loro fragilità, necessitano di una protezione → si vedono i dotti escretori delle ghiandole di Bowman che producono **muco**, il quale ha come funzioni:

1- impedire l'essicamento (base acquosa) e la distruzione delle ciglia.
2- barriera fisica e chimica contro patogeni e sostanze dannose.

La presenza del muco può costituire un problema per la solubilità dei composti idrofobici che sono i segnali olfattivi, ma vedremo che ci sono delle proteine utili a superare questo limite.
Gli assoni dei neuroni bipolari fanno contatto con le cellule mitrali in strutture anatomicamente definite nel bulbo olfattivo, che sono i **glomeruli**. Assoni delle cellule mitrali → tratto olfattivo → corteccia.

Le cellule di supporto dell'epitelio olfattivo hanno anche microvilli, più corti delle ciglia. L'epitelio olfattivo è l'organo con il più alto numero di recettori dopo la retina. La sua superficie varia (22 cm^2 nell'uomo, 7 m^2 nel cane), mediamente ci sono 5-10 milioni di neuroni olfattivi.

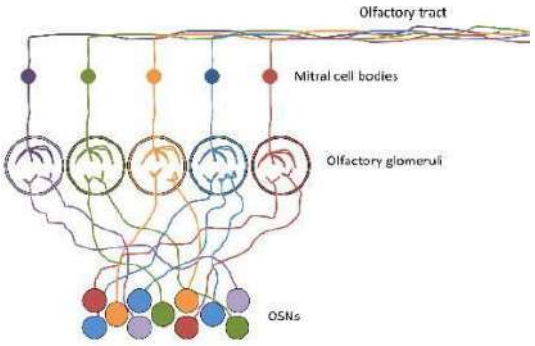


Olfactory receptor cells are constantly turned over. The source is stem cells within the olfactory epithelium. This is a highly regulated process and is being used as a model of neuronal stem cell biology. The axons of new ORNs penetrate into the OB. Special glial cells (ensheathing) facilitate this; ordinary adult glia block axonal regeneration; so the ensheathing cells are of interest to molecular neuroscientists interested in axonal regeneration. Further, the new ORN axons make correct connections in the OB: that is, to the glomerulus specified by the receptor type they express. The mechanism for such specific regeneration is unknown and also of intense interest.

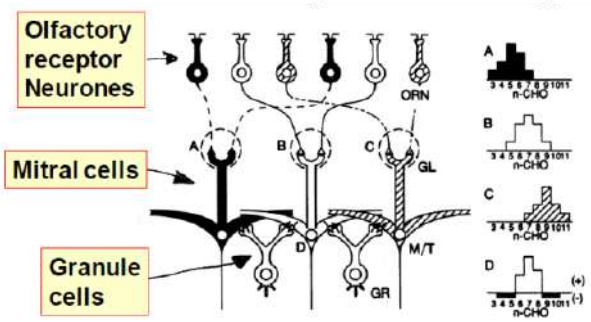
Vita media di un neurone olfattivo: 2-3 mesi. Quando degenera, un neurone è sostituito da un altro che esprime esattamente lo stesso recettore. Ci sono almeno mille sottotipi cellulari diversi, per il fatto che ci sono almeno mille recettori, e ogni cellula viene rimpiazzata da quella giusta, e questo è dovuto ad una serie di segnali chimici che caratterizzano la nicchia in cui si sviluppa la cellula staminale. Deve prima decidere se diventare cellula di sostegno o neurone olfattivo, poi una volta scelto neurone olfattivo deve andare incontro al susseguirsi dell'espressione di vari fattori solubili ben precisi e armonizzati. Non possiamo pensare di usare questi stessi meccanismi per rigenerare un neurone corticale che è andato incontro a morte, anche perché questi si sviluppano in un ambiente in cui le

cellule gliali inibiscono i fenomeni di rigenerazione, mentre in periferia gli oligodendrociti producono fattori trofici. Se pensiamo ai pesci, un'orata spinalizzata rimane ferma a virgola per dei giorni ma poi ritorna a nuotare. Inoltre, l'assone del neurone sostitutivo viene guidato verso il glomerulo del precedente → esperimento sulle **ensheathing cells** che fanno questo (guaine che guidano crescita assonale): trapianto nel midollo in un topo che ha lesione spinale → in una certa misura riescono a funzionare → prospettiva terapeutica possibilmente.

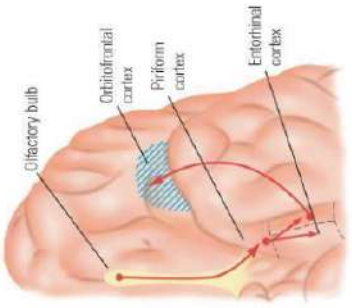
Ci sono 400 tipi recettoriali nell'uomo, circa 1000 nel topo.

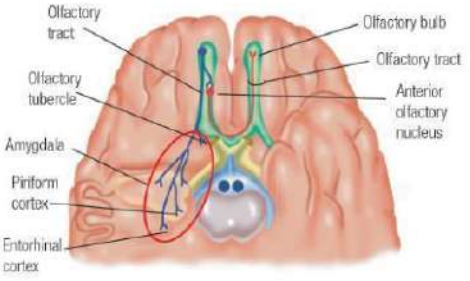


Regola 1:1:1. Un neurone olfattivo esprime un solo recettore olfattivo (possibili cambiamenti di pattern nello sviluppo) proietta ad un solo glomerulo olfattivo e fa sinapsi con una sola cellula mitrale. Neuroni olfattivi che esprimono lo stesso recettore appartengono alla stessa famiglia e proiettano allo stesso glomerulo (dimostrazione tramite marcature delle vie neuronali con la beta- galattosidasi). Mutando il recettore espresso da un neurone, talvolta l'assone viene indirizzato verso un nuovo glomerulo.



A livello del glomerulo si ha un'azione di filtro, **un'integrazione del segnale, grazie alle cellule dei granuli**. Un neurone olfattivo risponde in maniera massimale ad uno stimolo (es. aldeide con n atomi di carbonio), e risponde in maniera minore a stimoli simili (aldeide con n-2, n-1, n+1, n+2 atomi di carbonio). La cellula mitrale dovrebbe rispondere allo stesso modo, ma le cellule dei granuli realizzano un'inibizione laterale sulle cellule mitrali: una cellula che sta rispondendo in maniera massimale inibisce quelle che la circondano, annullando la loro risposta. In questo modo solo un glomerulo risponde ad un determinato stimolo, quindi il segnale è molto più chiaro e distinto. Per questo motivo parliamo di barriera glomerulare. Le cellule dei granuli o periglomerulari hanno un'azione inibitoria: immaginiamo di vedere un neurone a riposo, a -70 mV, serve uno stimolo che arrivi a soglia almeno, ci sono neuroni che in una situazione di riposo oltre ad avere i canali a perdita ha aperti anche i canali del K → è iperpolarizzata (il K tende a uscire per gradiente) → se le cellule glomerulari tendono a iperpolarizzare la cellula mitrale, se il recettore non viene stimolato al punto da depolarizzare a sufficienza la cellula mitrale (EPSP troppo basso), non si trasmette il segnale → il range degli stimoli a cui la via risponde viene ristretto.





Una volta che lo stimolo viene avviato, **Vie nervose olfattive**: recettori olfattivi → nervo olfattivo (primo paio di nervi craniali) → bulbo olfattivo → cellule mitrali e **a pennacchio** → tratto olfattivo → corteccia olfattiva primaria (corteccia piriforme, entorinale, amigdala e tubercolo olfattivo) → altre zone (talamo, ippocampo, corteccia orbitofrontale per l'integrazione con il gusto). Dal tratto olfattivo viene inviata una proiezione al nucleo olfattivo anteriore, che porta l'informazione al bulbo olfattivo contro-laterale. Dalla corteccia piriforme al talamo, e, come avevamo visto per il gusto, alla corteccia orbitofrontale → integrazione del segnale. La dimensione relativa del bulbo olfattivo varia in base all'importanza delle informazioni olfattive per quella specie (confronto uomo/ratto ad esempio). In realtà se si confronta un chihuahua con un bracco si vede che ciò che è rilevante è il numero di recettori, a cui corrisponde l'estensione dell'epitelio olfattivo, ma non necessariamente quella del bulbo olfattivo.

Imaging funzionale. Una cellula in attività aumenta il suo metabolismo, quindi assume più glucosio. Usando

isotopi radioattivi si possono marcare le cellule attive. Il glucosio viene metabolizzato dall'esochinasi, quindi si usa il deossi-glucosio, che entra nelle cellule, ma non viene metabolizzato. La molecola radioattiva emette positroni (anti-particelle degli elettroni), che possono essere rilevati. Lo shift tra punto di emissione e punto di annichilimento determina una risoluzione massima di 0,5 cm. Per produrre isotopi radioattivi con tempi di decadimento rapidi (pochi minuti) serve un ciclotrone. L'immagine generata è fatta di colori caldi (zone attive) e freddi (zone poco attive). E' una registrazione di massa. Da registrazioni del genere vediamo ad esempio che i due enantiomeri del limonene non vengono percepiti come odori distinti.

Registrazioni elettrofisiologiche su singolo neurone. Applicazione dello stimolo odoroso 1- al soma cellulare →nessuna depolarizzazione; 2- al dendrite → depolarizzazione; 3- al dendrite in seguito ad ablazione delle ciglia → nessuna depolarizzazione. => i recettori sono a livello delle ciglia.

Geni olfattivi. Nei mammiferi sono privi di introni, in altri animali invece li hanno (e possono fare splicing alternativo, es C. elegans). Codificano per proteine con 7 domini transmembrana, più una regione variabile sulla superficie cellulare e una coda citoplasmatica che interagisce con le proteine G.

L'epitelio olfattivo si evidenzia tramite immunoistochimica, con anticorpi contro l'OMP (marcatore olfattivo) e contro l'adenilato ciclasi III (presente nelle ciglia olfattive, colocalizza con le cellule olfattive ovviamente). L'epitelio olfattivo si può suddividere in 4 domini: i neuroni che esprimono un determinato gene recettoriale si trovano nello stesso dominio.

Attivazione del recettore → attivazione della proteina G olf → G olf alfa (questa volta) attiva l'adenilato ciclasi III →produzione di cAMP→ apertura dei canali cationici sensibili al cAMP sul lato citosolico (Ca++ e Na+ entrano)→ depolarizzazione della membrana + apertura dei canali Cl- (che esce) sensibili al Ca→intensa depolarizzazione (arriva alla zona trigger)→potenziale d'azione.

Blocco del segnale (fisiologico quando smette il la stimolazione del recettore):

1- il Ca++ attiva la fosfodiesterasi che degrada il cAMP (varie funzioni da secondo messaggero)
(ci sono anche proteine che sequestrano il calcio, che se va sotto la k_m per i canali Cl non li legano più)
2- altre proteine bloccano l'adenilato ciclasi.
3- **Desensibilizzazione da over-stimolazione** (quando il segnale persiste): il cAMP attiva la chinasi PKA, che induce altre chinasi a fosforilare i recettori. Il recettore fosforilato è riconosciuto dal sistema beta-arrestine/clatrina, rimosso dalla membrana e fagocitato.

Il sistema di fosforilazione della PKA in realtà è anche abbastanza grossolano, multi-target, il recettore olfattivo non sa distinguere se quella PKA è attivata da un'adenilato ciclasi attivata dallo stimolo olfattivo o qualsiasi altro stimolo con a valle l'attivazione della PKA. Lo stimolo olfattivo in realtà non lo decodifichiamo con i singoli recettori, dato che abbiamo 1000 recettori e 10 000 odori percepiti non possiamo avere 1:1 → stimolazione differenziale di singoli recettori. La necessità dei vari componenti si verifica con topi KO.

Elettro-olfatto-gramma EOG: misurazione dell'attività olfattiva. Topi KO per adenilato ciclasi III e Golf hanno EOG piatto. Queste molecole sono essenziali per la trasduzione del segnale

Patch-clamp: permette di misurare la corrente prodotta da un singolo neurone in risposta ad uno stimolo (misurazione a -55 mV)

Concentrazione crescente→frequenza di scarica crescente
Molecole simili, ma distinte→ glomeruli diversi

Anosmia: temporanea o permanente perdita del senso dell'olfatto. Le cause possono essere molteplici: alterazioni del setto, dei vasi, dei nervi, infiammazioni, traumi, tumori, invecchiamento…

Prendiamo tre stimoli diversi, e vediamo che neuroni diversi rispondono a stimoli diversi (con efficienze diverse), notiamo che però lo stesso neurone è in grado di rispondere a molecole strutturalmente non simili. Se sottoponiamo allo stesso panel di molecole un neurone con recettore noto e uno con recettore

sconosciuto, vediamo che i pattern di risposta sono diversi. Vediamo anche che tradizionalmente l'intensità dello stimolo viene codificata nella frequenza di scarica dei potenziali d'azione, a concentrazioni in aumento, ma vedremo che questa non è l'unica modalità. Se guardiamo il bulbo olfattivo, vediamo che odori diversi attivano diversi glomeruli ad intensità diverse. Prendiamo alcoli con n di C diversi: anche differenze così sottili nella struttura attivano glomeruli distinti in zone diverse del bulbo olfattivo.

Esperimenti di Axel e Buck, i primi ad aver isolato i recettori olfattivi, 1991 (e hanno decodificato il funzionamento)

Prima di loro, Amoore nel 1970 propose che siccome ci sono 40 anosmie specifiche nell'uomo, ci devono essere circa 40 recettori olfattivi. Non si riuscivano ad isolare perché a disposizione c'erano le tecniche della biochimica classica, serviva purificare una proteina di membrana poco espressa, quando già purificare una proteina in generale era difficile.

Dopo lo sviluppo della biologia molecolare dagli anni '80, Buck e Axel (Nobel nel 2004) partono da fatti noti: dopo stimolazione di neuroni olfattivi, aumentano i livelli di cAMP (in realtà a concentrazioni più alte aumentano anche i livelli di inositolo3P e Ca intracellulare) → dicono, è molto probabile che i recettori siano accoppiati ad una proteina Gs → probabilmente sono GPCR → fanno una sonda per le parti conservate, si aspettano che siano nell'epitelio olfattivo (vedremo che infatti sono lì ma anche altrove).

Deducono che i recettori olfattivi sono accoppiati a proteine G. Tramite reverse transcription PCR + ibridazione in situ trovano altri recettori accoppiati a proteine G: scoprono circa 1000 geni, tutti con la stessa struttura a 7 segmenti trans-membrana. Li classificano in famiglie in base alla similarità delle sequenze aa. Alcune zone presentano residui ipervariabili (lo capiscono facendo digestione con enzimi di restrizione e vedendo che se ogni frammento componesse il numero di bp del gene intero in realtà sarebbe incredibilmente più lungo → devono avere sequenze diverse), da cui dipende la sensibilità del recettore (in un certo senso come le Ig). Fanno PCR da singola cellula, capiscono che ogni neurone ha un solo recettore. (Coltura cellulare → odorante → imaging del calcio → selezione cellule che reagiscono → amplificazione di tutti i possibili recettori allora noti → identificazione prodotto PCR positivo per una coppia di primer soltanto)

Regole dell'espressione genica dei recettori olfattivi (alcune analogie con gli anticorpi)

1) **Principio di esclusione allelica**: dei due alleli di un recettore olfattivo, solo uno è espresso. La scelta è casuale.

2) **Un neurone olfattivo esprime un solo recettore olfattivo**. Dimostrazione tramite 1) imaging: una molecola determina l'aumento di Ca++ intracellulare in una sola sottopopolazione. 2) single cell RT-PCR: si usano 10 coppie di primers per 10 recettori olfattivi, ma solo una produce un amplificato.

3) Individuano 4 domini nell'epitelio olfattivo e vedono che **ogni neurone che esprime un determinato recettore olfattivo è localizzato all'interno di un solo dominio**, sono sparsi, ma lì.

4) Tutti gli assoni dei neuroni olfattivi con lo **stesso recettore** proiettano a **uno o pochi glomeruli** del bulbo olfattivo.

Se si usano animali con un recettore marcato con beta galattosidasi, su preparati fissati si può usare il galattosio per identificarli grazie alla colorazione blu, si vede che dalla periferia olfattiva, tutti gli assoni marcati convergono ad un particolare glomerulo. Per mantenere la direzionalità è importante che il recettore sia espresso → i KO del recettore mostra che nel tempo degenerano: il recettore è la conditio sine qua non il neurone si sviluppa. Se si ingegnerizzano i neuroni per esprimere un diverso recettore, si vede che gli assoni si ridirezionano al glomerulo di quel recettore. Vedono anche che ci deve essere altro, perché questo shift non funziona sempre → la presenza del recettore è necessaria ma non sufficiente.
Si fanno dei conti: 10 milioni di neuroni olfattivi, 1000 geni, ogni neurone esprime un recettore → ci devono essere 10.000 neuroni che esprimono un determinato recettore, ci son circa 1000 glomeruli, quindi circa 10 neuroni vanno nello stesso glomerulo (in realtà sappiamo che i geni funzionali sono ⅓, il numero di

neuroni che esprimono un determinato recettore sarà più alto, quindi anche la convergenza nei glomeruli, anche se non è un solo glomerulo che riceve tutti i neuroni dello stesso tipo, ma 4-5).

Prendono una serie di molecole e fanno una matrice in cui per colonne varia il numero di atomi di C e resta lo stesso gruppo funzionale, per righe viceversa. Trovano che recettori diversi hanno diverse risposte a diverse molecole. Abbiamo un numero limitato di recettori, un numero di stimoli più grande → è un codice combinatorio che attiva recettori diversi. C'è un codice che identifica ogni singola molecola, e si riesce anche a discriminare le varie concentrazioni. All'aumentare della concentrazione aumenta il numero di recettori coinvolti nel riconoscimento della sostanza. Da un punto di vista chimico è chiaro che sia così perché recettori diversi hanno diverse soglie, in ogni caso si ha che ogni molecola viene riconosciuta da una componente base di recettori, le concentrazioni vengono codificate aggiungendo termini a questa componente base. Se una molecola viene riconosciuta da 4 recettori, si avranno 4 sottopopolazioni attive, ciascuna che invia assoni ad un particolare glomerulo. Dalla periferia al bulbo avremo 4 glomeruli al bulbo olfattivo → questa convergenza massimizza la sensibilità allo stimolo grazie ad una sommazione, e poiché i neuroni che vengono rimpiazzati sono sempre con il recettore e la proiezione mantenuta, questo rende più facile stereotipizzare la risposta e quindi costruire una **memoria olfattiva**.
A livello corticale cosa succede? Vediamo innanzitutto che i neuroni corticali che ricevono le info dalla periferia si ha una mappa stereotipata interindividuale.
Abbiamo un sistema in cui a livello corticale si hanno risposte A recettore → A glomerulo → A neurone, oppure un'altra possibilità è che un neurone corticale risponda anche a stimoli di altri neuroni olfattivi. Nei due casi cambia la superficie corticale necessaria: nel primo caso servono 1000 popolazioni corticali, nel secondo molti meno. Quello che succede è che in corteccia si hanno neuroni che agiscono come **sensori di coincidenza**. Supponiamo che la vanillina attivi i recettori 1-4 a livello periferico. A livello corticale i neuroni si attivano grazie agli stimoli del 2, altri dall'1 e dal 3 ma non dal 2 e così via. Poi ci saranno neuroni che percepiscono tutti e 4. Questo sistema taglia il rumore di fondo: si attivano soltanto quando la stimolazione è contemporanea su tutti i recettori che codificano la percezione della molecola. Se un neurone si attiva solo se 1-2-3-4 sono attivi contemporaneamente, e in periferia questo avviene con la vanillina, allora quel neurone è associato alla vanillina.

Recap-Funzionamento del sistema olfattivo. A livello dell'epitelio olfattivo l'odore viene "scomposto" e attiva una serie di neuroni olfattivi specifici. Questi proiettano ai rispettivi glomeruli olfattivi. Buck e Axel realizzano una matrice di molecole che si differenziano per la lunghezza della catena principale e per il gruppo funzionale. Saggiano vari recettori con concentrazioni crescenti delle varie molecole, e osservano in quali casi si ha una risposta. Ogni molecola determina l'attivazione di un pattern di recettori univoco (che coinvolge fino a 8 recettori diversi). **Codice combinatorio**: un recettore può attivarsi in risposta a più molecole → combinazioni di 350 recettori: potenzialmente possiamo riconoscere oltre 100.000 odori diversi.

Percezione della concentrazione di una molecola:

- Aumento della frequenza di scarica del singolo neurone
- Attivazione di sottopopolazioni di neuroni con soglia via via più alta (fino a 3 tipi per la stessa molecola)

Potremmo pensare che la scomposizione presente a livello periferico e bulbare rimanga anche a livello corticale (secondo la regola 1:1:1). A livello periferico e bulbare, la scomposizione permette di massimizzare la sensibilità agli odori a basse concentrazioni: tanti neuroni primari convergono su un solo glomerulo, quindi si ha l'integrazione del segnale (tanti stimoli sottosoglia→uno stimolo sovrasoglia). Per mantenere la scomposizione anche a livello centrale sarebbe necessaria una corteccia piriforme piuttosto ampia. **I neuroni corticali agiscono invece da rilevatori di combinazioni**: considerati 3 recettori olfattivi, a livello corticale abbiamo neuroni che rispondono a 1, 2, 3, 1-2, 1-3, 2-3, 1-2-3. Solo la combinazione esatta attiva quel neurone. Una combinazione di glomeruli attiva quindi uno specifico cluster di neuroni corticali. Non si ha quindi una corrispondenza ordinata, come avviene per l'udito (i neuroni sono distribuiti nell'organo del Corti in base alla frequenza del suono che possono rilevare). Tuttavia la posizione dei cluster neuronali

dovrebbe essere identica in individui diversi.**-Fine recap**

Altro problema: natura chimica degli stimoli olfattivi. Le molecole odorose sono volatili e lipofile. Il muco è prevalentemente acquoso, quindi la frazione di molecole che si scioglie in esso è minima (non si ha solubilità nulla, ma minima, e potrebbe comunque essere sufficiente in teoria). Per questo motivo nel muco sono presenti abbondantemente (concentrazione millimolare, enorme e costosa energeticamente) le **odorant-binding proteins OBPs** (superfamiglia delle lipocaline). Si trovano anche nella linfa delle antenne delle farfalle troviamo proteine della stessa famiglia ma che legano i feromoni, anche nell'organo vomeronasale dei vertebrati. Chiaramente non sono recettori perché sono nella frazione solubile → più facile la purificazione.

- basso peso molecolare
- residui di cisteina che formano ponti disolfuro (numero conservato nelle specie)
- forma a barile, che circoscrive una tasca idrofobica e un esterno idrofilo (caratteristica lipocaline)
- legano le molecole odorose e i feromoni in maniera molto selettiva
- presenti nel muco e nelle antenne degli insetti (la struttura è sensibile al pH), oltre che in tutti i vertebrati

  possibile funzione della dipendenza dal pH=a pH neutro il ligando lega peggio il sito di legame, perché questo ha una struttura più definita a pH acido. Quando sono all'interfaccia con l'aria, a pH acido, si lega, e viene rilasciato in ambiente acquoso più neutro.

Saggio di selettività delle OBP: saggi di binding radioattivo. Marco il ligando, lo metto in soluzione con un filtro imbibito con sostanza che lega le proteine e poi aggiungo il ligando triziato, e vedo che esso è marcato usando uno scintillatore. Prendo una molecola qualsiasi: prendo OBP, ne imbevo il dischetto, e un ligando noto che si lega al dischetto. Faccio passare la molecola qualsiasi: se non si lega passa e va via, altrimenti va in competizione con il ligando noto che c'è già sul dischetto. A concentrazioni via via crescenti vedrò calare la radioattività. Ripetendo questo per molte molecole, vediamo che le OBP sono poco selettive. Le lipocaline sono legate alla comunicazione olfattiva: afrodisina nell'hamster (nello scarico vaginale odorato dal maschio nella zona perivaginale). Ci sono infatti differenze di espressione legate al sesso.

Svolgono ruoli aspecifici (selettività blanda) **e specifici:**

- indurre la solubilizzazione delle molecole lipofile nel muco
- funzione di carrier attraverso lo strato di muco (li legano esposti all'aria e li portano fino al R sotto il muco)
- selezionare gli odori e modularne le concentrazioni
- determinare la stereo-selettività nella percezione degli odori
- in certi casi solo il complesso odore-OBP può stimolare il recettore

Dimostrazione ruolo OBP nell'olfatto: Esperimento con Drosophila melanogaster, sechellia, simulans nella percezione di acido esanoico e ottanoico. Indurre l'espressione di determinate OBP permette di ricreare i comportamenti specifici, quindi le OBP sono fondamentali per la percezione dell'odore.

In certi casi solo il complesso odore-OBP può stimolare il recettore. Il legame dell'odore all'OBP determina un cambiamento conformazionale. La stessa pianta attrae la sechellia e repelle la simulans, mentre melanogaster non la percepisce. Comportamento legato all'espressione di OBP. Ingegnerizzazione di una specie con i geni dell'altra, e i comportamento si modifica a coincidere con quello della specie da cui sono presi i geni, qualunque sia il ruolo delle OBP. Una dimostrazione di ruolo: se tramite mutagenesi sito-specifica si inducono delle modifiche strutturali che rendono l'OBP scarica simile al complesso OBP-odore, si può avere percezione dell'odore anche in assenza della molecola.

Espressione ectopica di recettori olfattivi e gustativi

Recettori gustativi e olfattivi sono presenti anche al di fuori degli organi di senso di gusto e olfatto : 1-

Recettori per il dolce nell'intestino (cellule duodenali).

C'è tutto il sistema di trasduzione del segnale, manca solo il collegamento con il sistema nervoso. Gli enterociti L producono GLP-1 (glucagon like peptide 1, incretina) al transito delle molecole dolci, altre cellule producono altri ormoni del metabolismo (come GIP). Un topo KO per l'alfa-gustducina non ha gravi alterazioni a livello gustativo (altre proteine G possono sopperire alla sua assenza), ma mancano gli ormoni digestivi (si vede facendo iniezioni di glucosio nell'intestino dei topi, e poi misurando la glicemia; quantificando qnche la produzione di GLP-1). Di conseguenza varia il livello di insulina, tutto il metabolismo glucidico è alterato. La stimolazione dipende da zuccheri specifici (es. saccarosio, glucosio, non 2-desossiribosio). La risposta non si registra se si usano inibitori della gustducina o dei recettori del dolce.

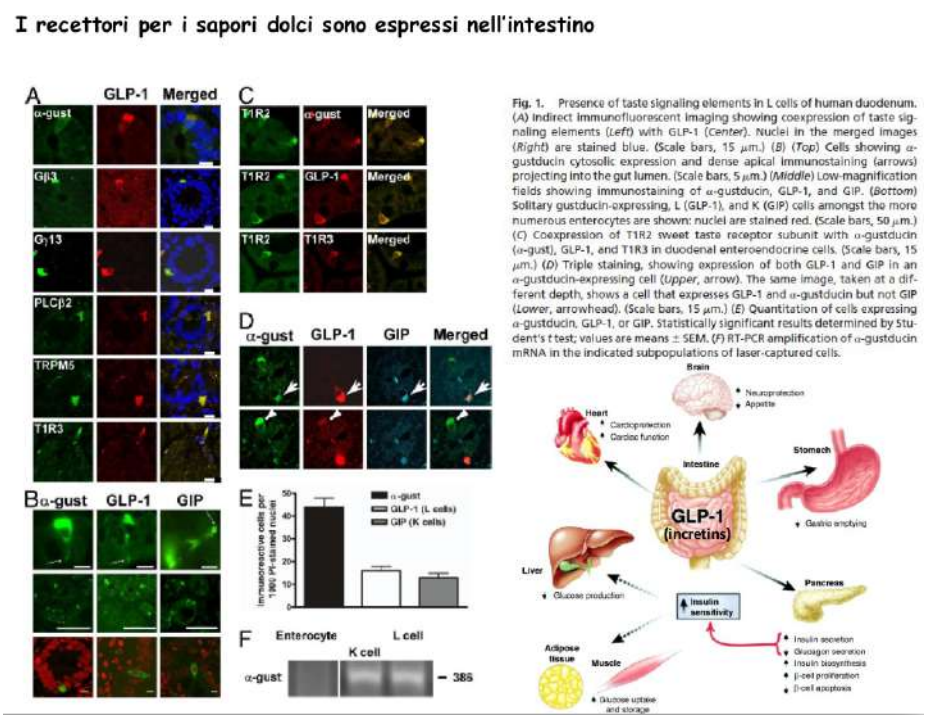


Fig. 1. Presence of taste signaling elements in L cells of human duodenum. (*A*) Indirect immunofluorescent imaging showing coexpression of taste signaling elements (*Left*) with GLP-1 (*Center*). Nuclei in the merged images (*Right*) are stained blue. (Scale bars, 15 μm.) (*B*) (*Top*) Cells showing α-gustducin cytosolic expression and dense apical immunostaining (arrows) projecting into the gut lumen. (Scale bars, 5 μm.) (*Middle*) Low-magnification fields showing immunostaining of α-gustducin, GLP-1, and GIP. (*Bottom*) Solitary gustducin-expressing, L (GLP-1), and K (GIP) cells amongst the more numerous enterocytes are shown: nuclei are stained red. (Scale bars, 50 μm.) (*C*) Coexpression of T1R2 sweet taste receptor subunit with α-gustducin (α-gust), GLP-1, and T1R3 in duodenal enteroendocrine cells. (Scale bars, 15 μm.) (*D*) Triple staining, showing expression of both GLP-1 and GIP in an α-gustducin-expressing cell (*Upper*, arrow). The same image, taken at a different depth, shows a cell that expresses GLP-1 and α-gustducin but not GIP (*Lower*, arrowhead). (Scale bars, 15 μm.) (*E*) Quantitation of cells expressing α-gustducin, GLP-1, or GIP. Statistically significant results determined by Student's *t* test; values are means ± SEM. (*F*) RT-PCR amplification of α-gustducin mRNA in the indicated subpopulations of laser-captured cells.

Dati i vari effetti del GLP-1, produrlo fa bene: la possibilità è che l'evoluzione abbia usato come regolatori i pathway del gusto e dell'olfatto per regolare questa produzione.

2- Il livello di espressione di Tas1R1 nel rene e nei testicoli è equivalente a quello della lingua

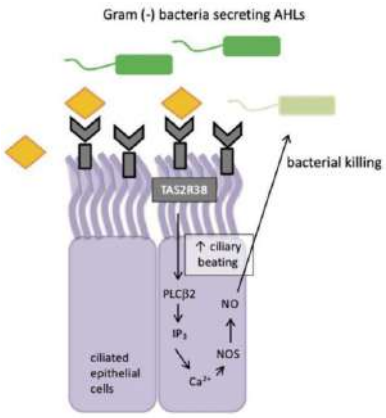
3- Recettori per l'amaro nell'intestino

Con le cellule entero-endocrine si può realizzare un sistema simile a quello delle cellule HEK. Le cellule rispondono alla PTC (hanno TAS2R38)⟶ aumento di Ca++ intracellulare⟶esocitosi delle vescicole contenenti ormoni (coleicistochinina, GIP, GLP1, PYY ⟶ fanno produrre insulina al pancreas, agiscono direttamente sul vago, modulano centri ipotalamici legati alla funzione energetica)

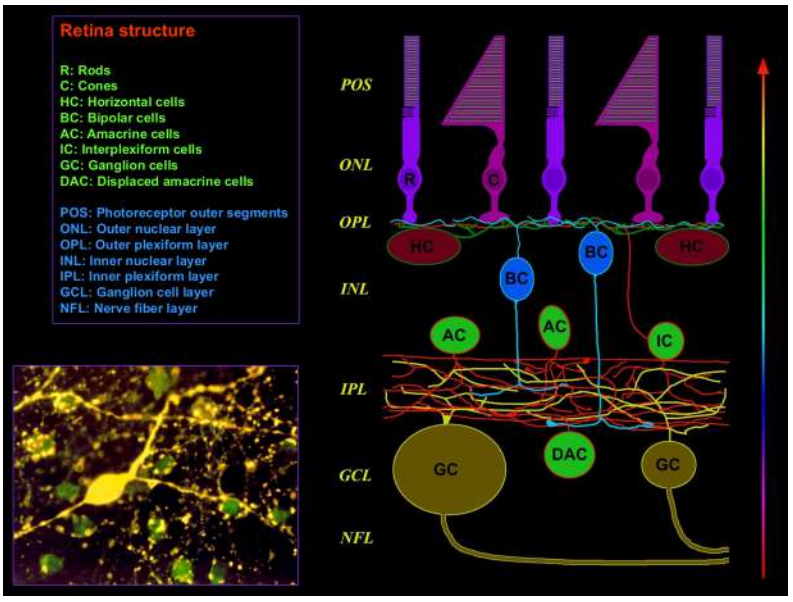
I recettori non sono solo espressi, sono anche funzionali. Dal momento che tutti gli ormoni hanno una conseguenza positiva sull'assorbimento intestinale e sul comportamento alimentare, pensare di avere pasticche che stimolano un recettore potrebbe essere utile per chi non assume dei nutrienti per motivi di sapore sgradevole del cibo. Le ammine biogene, gli acidi grassi sono in grado di indurre la produzione di ormoni. Nel topo gli omega 3 legano i propri recettori nel tessuto adiposo e stimolano la produzione energetica per termogenesi. Nelle vie aeree ci sono TAS3R38 e 14 nell'epitelio ciliato⟶ aumentano secrezione ed esportazione del muco con effetti battericidi ⟶ lavoro in cui si osserva una importanza fondamentale dei recettori di questo tipo che potrebbero in certi casi far bypassare l'uso di antibiotici, ad esempio nelle riniti croniche (v. avanti). Espressione ectopica di recettori olfattivi, di nuovo nel tessuto adiposo lo stimolo dell'acido azelaico favorisce la lipogenesi nel topo (vedi tabella slide 17-18 lezione 4). Nel caso del vino rosso, gli antiossidanti che sono efficaci in vitro lo sono a concentrazioni per cui servirebbe una damigiana a pasto, dato che nel

vino le concentrazioni sono molto inferiori, in realtà si hanno effetti sinergici di più molecole contemporaneamente. Tra le funzioni che questi nutraceutici hanno, c'è la riduzione della senescenza nella prostata; possono stimolare la chemotassi e la motilità degli spermatozoi (burgeonale).

Esempio del TAS2R38 espresso a livello bronchiale per dilatare i bronchi non usando l'adrenalina. Il problema degli autori (Hariri et al., 2017) è che la rinosinusite cronica è una sindrome infiammatoria antinfettiva del tratto respiratorio che riduce la capacità respiratoria del paziente → servono antibiotici, il 20% delle cure antibiotiche negli USA è rivolto alle rinosinusiti croniche. Eccessiva produzione di muco e infezioni ricorrenti → alto contributo alla resistenza antibiotica. Il TAS2R38 è legato dall'acil-omoserina lattone (AHL) una molecola per il QS dei G- (rispetto alla PTC ha il vantaggio di non essere protumorale)→ l'attivazione del recettore → via ossido nitrico → PKAg→ aumento motilità ciliare e capacità mucosecretorie. In accordo, si vede che pazienti AVI per il TAS2R38 hanno forme più severe di CRS. Un'altra cosa che sanno dalla letteratura è che alcuni lattoni attivano anche altri recettori per l'amaro, tra cui il 14. Usano quindi vari tipi di flavoni (attività antibatterica, antinfiammatoria, antiossidante), fra questi crisina e digenina attivano il recettore 14 → vediamo se hanno un effetto contro la CRS. Osserviamo che comunque stiamo parlando di produzione di acido nitrico: acuta fa bene, cronica no, così come l'infiammazione e lo stress ossidativo (poco fa bene perché modula l'attività di alcune proteine). Quindi in questo caso delle tre ossido nitrico sintasi se si attiva la terza, che lo produce in concentrazioni mM, allora si ha infiammazione → usato come marker di infiammazione. Gli autori quindi prendono una serie di flavoni e vedono cosa succede su vari tipi cellulari dell'epitelio (il risultato è sempre paragonabile indipendentemente dal tipo) e vedono i marcatori di infiammazione → la produzione dei marker infiammatori si abbassa: i flavoni riducono lo stress infiammatorio, usano come marker la ossido nitrico sintasi inducibile, misurano l'effetto dei flavoni su quella endoteliale, e vedono che non c'è modulazione su di essa. Dimostrano usando anticorpi per il recettore che questi sono sulle cilia, dimostrano che con il trattamento la frequenza del battito ciliare aumenta e che la risposta è mediata dall'NO sintasi endoteliale, che non aumenta i propri livelli di espressione ma ha una funzione essenziale: in sua assenza il battito delle cilia si ferma (misurano la motilità usando una misura indiretta, gli spike di Ca, ogni volta che entra si muovono).



RIPASSO SU RETINA E FOTOTRASDUZIONE

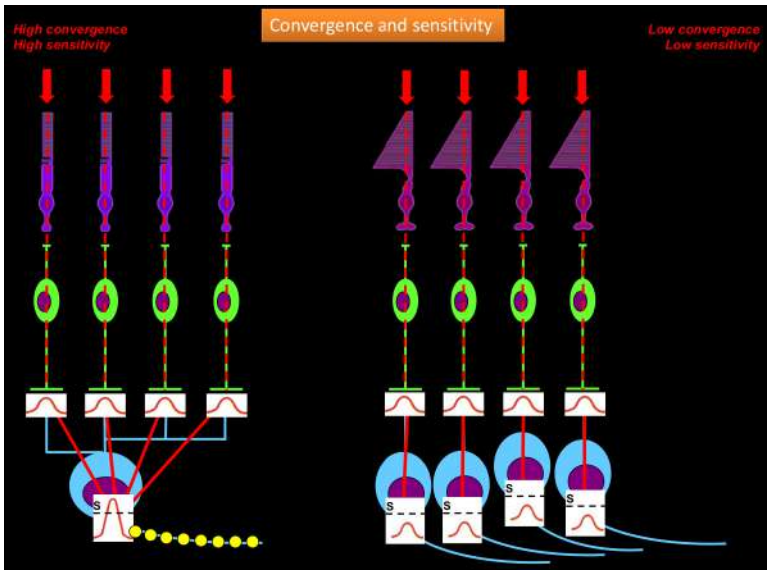


La luce attraversa tutta la retina, che funziona da filtro per la luce in modo che sia smorzata, animali marini che vivono al di sotto dei 100-200 m di profondità hanno una retina inversa in cui i recettori sono le prime cellule che la luce (blu a bassa intensità quella che penetra di più) incontra nella retina. Lo strato più esterno inoltre è pigmentato, in modo che i raggi che non sono assorbiti dalla retina non riflettano, per cui i fotorecettori sarebbero eccitati dalla luce riflessa e non quella in arrivo. Negli animali che vivono nelle profondità marine, questo strato è composto da cristalli di guanina che formano praticamente uno specchio, quindi la luce che arriva viene amplificata in modo per massimizzare le informazioni luminose → è chiaro che il pesce così non ha una visione distinta (che infatti neanche noi avremmo senza lo

strato pigmentato) ma è in grado di individuare la fonte. Pensiamo al pesce con la lanterna, famiglia **Myctophidae**, che è resa fluorescente da colonie batteriche, riesce ad attrarre i piccoli pesci che sono le sue prede così.
La retina è parte del SNC nonostante sia in posizione periferica → formata a strati come la corteccia. Lo strato più esterno (sotto l'epitelio pigmentato, che è monostratificato ma non piatto, perché serve anche a fagocitare i dischi più esterni dei fotorecettori che progressivamente vanno in degenerazione). C'è il POS, segmento esterno dei fotorecettori per la captazione del segnale, poi ONL outer nuclear layer con il soma dei fotorecettori, sotto le sinapsi tra fotorecettore e cellula bipolare, e anche cellule orizzontali, poi INL inner nuclear layer con il soma di alcune cellule amacrine e orizzontale, strato plessiforme interno con le sinapsi tra cellula bipolare, ganglionare e amacrina, GCL soma di cellule ganglionari e amacrine, e poi NFL strato delle fibre nervose che raccolgono gli assoni che costituiranno il nervo ottico.

Flusso di informazione: direzione verticale da fotorecettori (nt)⟶ cellule bipolari (nt)⟶ cellule ganglionari, queste ultime le uniche a generare un PdA. Quando una cellula non può generare un potenziale d'azione? Cioè, perché esso si genera solo sull'assone e non sui dendriti? Per la presenza dei canali Na/K voltaggio-dipendenti, e infatti tutte queste cellule tranne le ganglionari non ne hanno → come fanno a liberare un Nt? Lo fanno in base alla depolarizzazione della membrana, che media l'accumulo di Ca e il rilascio delle vescicole. Quindi il flusso delle informazioni è lungo le colonne verticali, che però non sono isolate le une dalle altre, perché le cellule orizzontali e le cellule amacrine creano collegamenti orizzontali.

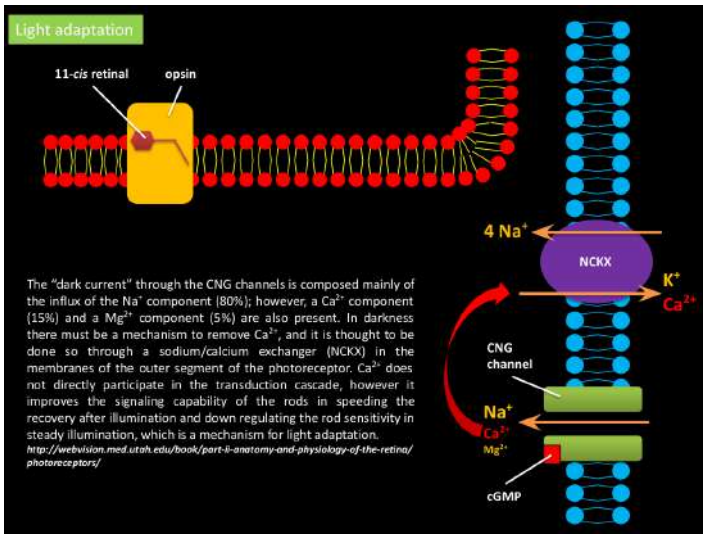
Fovea: regione della retina deputata alla visione distinta, perché? Innanzitutto ha uno spessore minore del resto della retina perché in questa zona si fanno da parte gli strati superiori ai recettori, nel senso che si dispongono orizzontalmente → la luce che arriva ai fotorecettori non è schermata → arriva con la sua massima intensità possibile (dopo inevitabile schermatura della cornea e del cristallino). Inoltre, è la regione in cui si trovano i coni mentre i bastoncelli sono nelle parti più periferiche della retina. Se si guardano le caratteristiche si vede che alcune sono simili: le dimensioni relative del segmento esterno dei bastoncelli sono molto più estese, ma la struttura è simile, si hanno ripiegamenti di membrana che creano dei dischi che servono ad aumentare la superficie di membrana dotata di fotopigmenti. In entrambi i tipi c'è una zona interna in cui si trovano nucleo e organelli, e infine in tutti c'è la parte finale della cellula che funziona come un assone e attraverso la quale quindi avviene il rilascio di glutammato. Le differenze quindi sono morfologiche. Da un punto di vista funzionale hanno localizzazioni diverse, i coni sono dotati di elevata acuità visiva, che invece è bassa per i bastoncelli. L'acuità visiva è legata alla convergenza → cioè cellule fanno sinapsi con meno cellule che fanno sinapsi con ancora meno cellule →⟶ nei coni ho scarsa convergenza (virtualmente 1:1:1) mentre nei bastoncelli alta, cioè tanti bastoncelli convergono su una cellula bipolare, tante bipolari su un'unica ganglionare. Quindi avere alta convergenza destina a una scarsa acuità visiva, ma fa guadagnare alta sensibilità alla luce (visione al buio). I coni poi hanno tre sottopopolazioni caratterizzate da diversi fotorecettori con uno spettro ristretto attorno a caratteristiche lunghezze d'onda, mentre tutti i bastoncelli hanno rodopsina, con uno spettro più ampio.

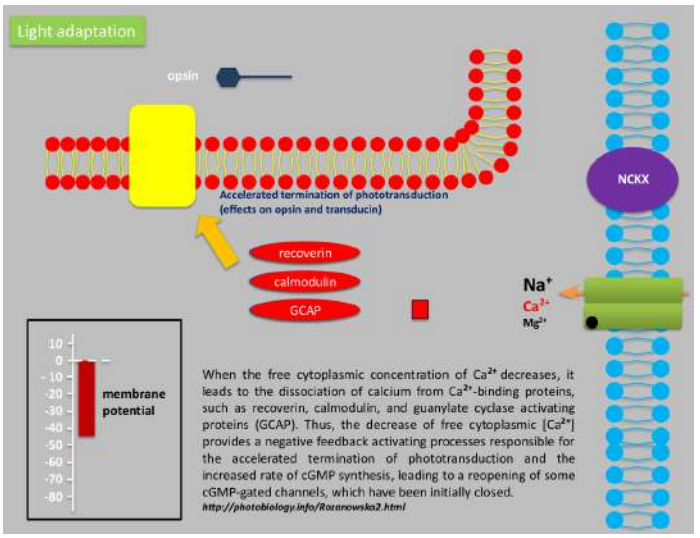


Chiariamo perché la convergenza si accoppia all'acuità. Confrontiamo una visione bastoncellare e una mediata da coni: Se una cellula ganglionare viene contattata da n cellule bipolari, a loro volta contattate da m recettori, allora basta che uno qualsiasi degli n neuroni che la contattino la attivi e questa si attiverà senza distinguere da dove è arrivato lo stimolo. Per i coni invece ogni cellula ganglionare si attiva in seguito all'attivazione di un unico e determinato cono. **Campi recettoriali**: dove c'è alta densità di recettori, c'è maggiore possibilità di discriminazione spaziale degli stimoli, perché non c'è sovrapposizione dei campi recettoriali. Con pochi recettori ho un'alta convergenza, quindi non si discrimina. Le immagini che vengono dalla periferia della retina quindi sono fuori fuoco, se invece fisso l'oggetto e l'immagine cade sulla fovea, allora sono messi a fuoco e percepiti nitidamente. Nella versione notturna, se n diversi bastoncelli contattano n cellule bipolari che contattano tutte la stessa ganglionare producendo EPSP, se questi sono singolarmente sotto soglia ma con una sommazione spaziot-emporale si ha alla fine un EPSP che

arriva sopra soglia nella zona trigger. Questa sommazione in un circuito 1:1:1 come quello dei coni non si ha nelle cellule ganglionari. Questa convergenza in effetti si vede confrontando il numero (milioni) di coni/bastoncelli 1/120, le cellule bipolari sono 3,5 milioni e le cellule ganglionari ancora meno. Mediamente 40 fotorecettori fanno sinapsi con una cellula bipolare e circa 4 bipolare con una ganglionare, se si considera la convergenza allora i coni ne faranno molto meno di 40:1 e i bastoncelli di più. Ci sono 2 sottotipi di bipolari, on-off, 25 di ganglionari almeno.

Fototrasduzione: si hanno inizialmente i recettori, GPCR, una opsina, nei bastoncelli solo rodopsina, mentre nei coni tre distinte conopsine, ma il funzionamento è comune alle tre. Funziona perché associata ad un gruppo prostetico, il retinale. Nella rodopsina ci sono doppi legami coniugati → al buio è in 11-cis. (Se tutti i legami sono in trans allora ci immaginiamo una catena lineare, che si ripiega a nel caso in cui un legame si trasformi in cis, così in questa conformazione si ha il legame della rodopsina nel sito di legame al TM7).
Nella membrana plasmatica del segmento esterno sono presenti dei canali cationici che fanno passare principalmente sodio (anche calcio e magnesio) verso l'interno → al **BUIO** questi sono aperti perché c'è un'alta concentrazione di cGMP che sono ligandi di questi canali. In questa condizione di buio, la rodopsina non è attiva e non interagisce con la sua proteina G, **trasducina**, che non interagisce la fosfodiesterasi specifica per il cGMP → alti livelli di cGMP → aperti i canali → ingresso di ioni positive → depolarizzazione a -40 mV → apertura dei canali Ca voltaggio dipendenti → liberazione di glutammato.
LUCE. il retinale diventa all trans, si distacca dalla rodopsina → interazione con la trasducina → sub alfa della trasducina scalza le gamma regolatorie della fosfodiesterasi → attivazione fosfodiesterasi → diminuzione livelli di cGMP sotto la costante di affinità per il canale → canale chiuso → iperpolarizzazione a -70 mV → no liberazione di glutammato.





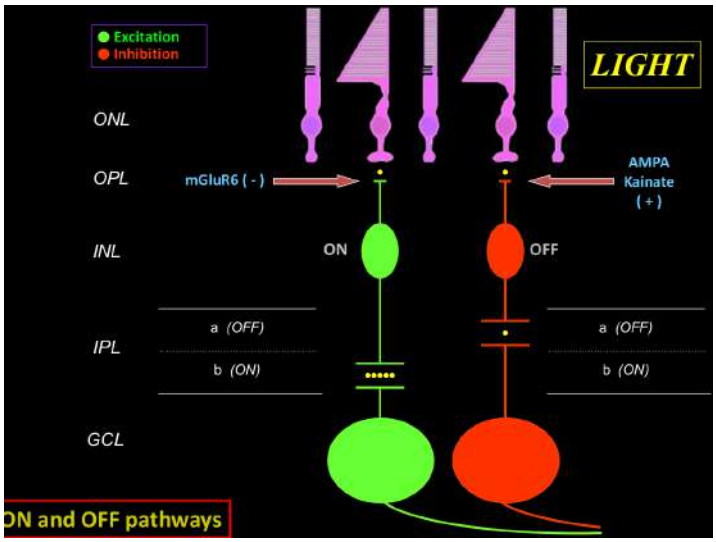
Al buio quindi i fotorecettori consumano tantissima energia per mantenere questa corrente.

L'11-cis-retinale deve essere rigenerato per permettere il ciclo → altra funzione dell'epitelio pigmentato.

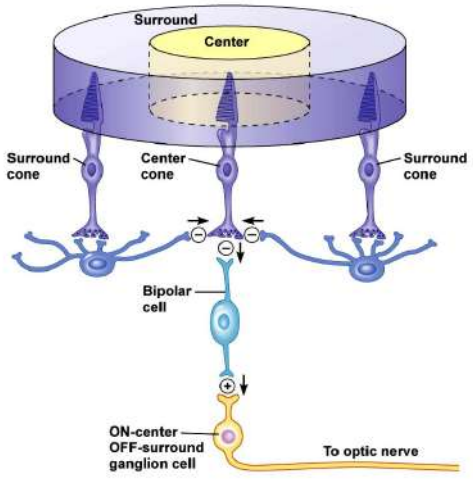
Ci sono anche meccanismi che regolano la quantità di Ca (perché la depolarizzazione è mantenuta anche dal Ca, che però è anche un secondo messaggero) → meccanismi di trasporto attivo secondario che estromettono continuamente Ca e K scambiandoli con il Na, secondario perché è l'ingresso del Na secondo gradiente (dG negativo) che si accoppia ad un'estromissione non spontanea degli altri ioni, infatti accoppiando un processo a dG negativo con uno a dG positivo, se quello totale è negativo si rende spontaneo l'intero processo → la compensazione qui si ha con 4 Na/1 Ca +1 K → il trasportatore non richiede *in sé* energia ma sfrutta quella consumata dalla sodio-atpasi.
Alla luce, il funzionamento del trasportatore abbatte il Ca intracellulare → si riattivano delle proteine che permettono di ricaptare l'11-cis-retinale: When the free cytoplasmic concentration of Ca 2+ decreases, it leads to the dissociation of calcium from Ca 2+ -binding proteins,such as recoverin, calmodulin, and guanylate cyclase activating proteins (GCAP). Thus, the decrease of free cytoplasmic [Ca 2+] provides a negative feedback activating processes responsible for the accelerated termination of phototransduction and the increased rate of cGMP synthesis, leading to a reopening of some cGMP-gated channels, which have been initially closed (buio). http://photobiology.info/Rozanowska2.html

Il glutammato è noto come il principale Nt eccitatorio, rilasciato al buio quando non vediamo niente. Cosa succede? In realtà sappiamo che la risposta dipende dai recettori: i recettori ionotropici e alcuni metabotropici per il glutammato mediano risposte eccitatorie, mentre altri metabotropici inibitorie. Altra complicazione le cellule bipolari e ganglionari

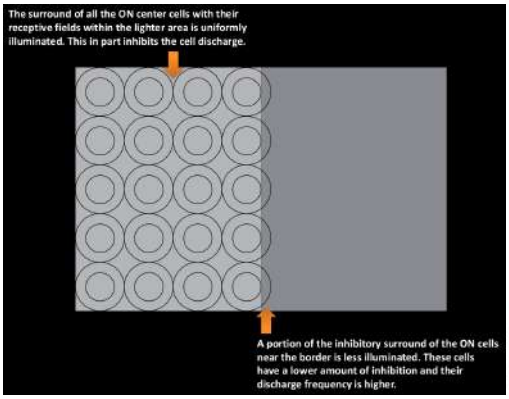
hanno risposte diversificate alla luce e al buio in base ai recettori che esprimono.
Esperimenti in cui un soggetto fissa uno schermo su cui compaiono spot luminosi: mostrano che le cellule ganglionari producono delle scariche toniche. Se sposto lo spot, nella periferia, allora aumenta la frequenza di scarica → è nel campo recettoriale di quella cellula ganglionare. Continuo a spostare lo spot e registrare le differenze di frequenza che si misurano (maggiore o minore di quella tonica) → si ottiene un campo percettivo circolare in cui zona centrale e periferica hanno comportamenti opposti→ centro off e periferia on o viceversa (questo vale solo per i coni, il fatto delle due popolazioni opposte, i bastoncelli hanno solo centro on).
Centro on: stimolazione al centro aumenta la frequenza di scarica, diminuisce nella periferia, a cavallo si ha un aumento tanto più alto quanto più lo stimolo interessa il centro piuttosto che la periferia. Lo stimolo più efficace è quello che copre completamente tutto il centro nell'interezza del suo diametro, lo stesso vale per la corona circolare in periferia. L'estensione di un campo dipende dalla convergenza. Una cellula a centro off funziona simmetricamente.

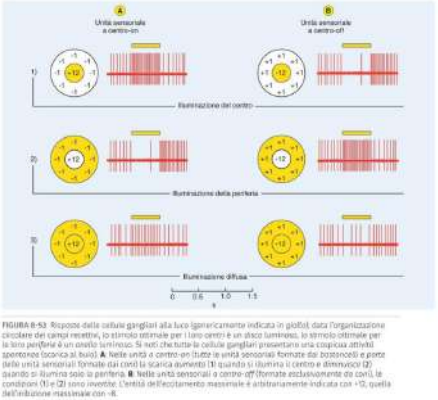


Funzionamento verticale. Cellule ganglionari off/on perché associate a bipolari on/off → vie on/off. A parità di rilascio di Nt dei recettori, la cellula bipolare ON libera poco Glu sulla ganglionare, mentre la off tanto → la ON è attivata poco e la OFF è molto attivata, ne abbatte la frequenza di scarica → al buio non attivo le vie ON e mantengo attive le OFF → non vedo niente. Ora la domanda è <u>perché ho questa differenza di rilascio di Glu nelle bipolari ON/OFF?</u> Perché le cellule ON hanno mGluR6 inibitori, mentre le OFF hanno gli AMPA kainato che depolarizzano la OFF. Alla luce, si ha meno Glu → le vie ON sono meno inibite → più Glu sulle ON. Sulla OFF → riduzione cellule bipolari → meno eccitate le ganglionari.



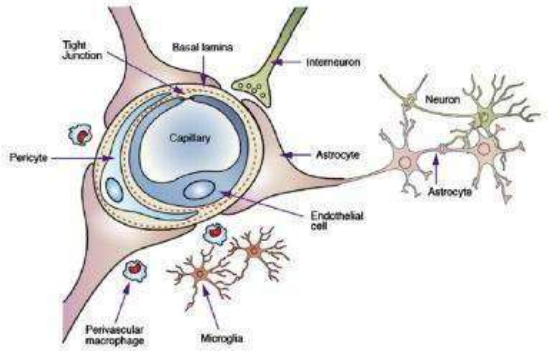
In realtà il tutto è complicato dalla presenza delle cellule orizzontali. Se guardiamo un campo recettoriale a centro ON, vediamo che con la cellula bipolare sono in contatto i coni nella zona ON, i coni della periferia antagonista non sono in diretto contatto ma modulano l'attività delle cellule bipolari tramite le cellule orizzontali. Il cono centrale libera Glu che tende ad inibire la cellula bipolare. I coni nella periferia OFF liberano il Glu e stimolano le cellule orizzontali a produrre GABA, inibitorio.
Se attivo il centro ON ho un aumento di scarica della ganglionare. Se utilizzo una luce diffusa contemporaneamente al centro e nella periferia, ci sono meccanismi inibitori che mascherano l'eccitazione ON. Se stimolo solo la OFF si ha un'inibizione che può abbassare la frequenza di scarica fino ad annullarla.
<u>Qual è poi l'utilità di avere vie ON/OFF?</u> Ad aumentare i contrasti. Quadratini in scala di grigio: quello che fa fede per la discriminazione è la differenza.





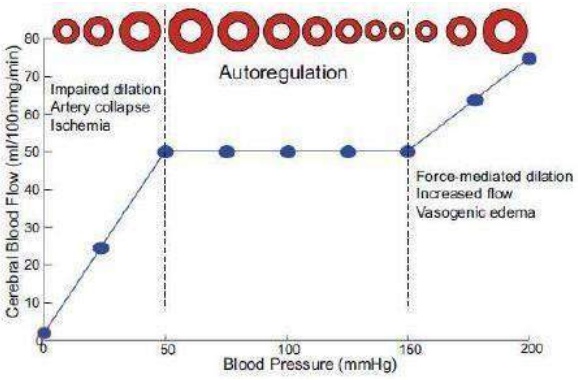
BARRIERE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Il SNC non crea riserve di nutrienti, ha bisogno di un afflusso continuo di ossigeno e nutrienti. Le neuroglobine (simili alla mioglobina) garantiscono una minima riserva di ossigeno. **L'UNITA' NEUROVASCOLARE** è un insieme integrato di neuroni, vasi, periciti e matrice cellulare. Siccome il cervello è contenuto in una teca ossea, **il flusso sanguigno deve rimanere costante**, per evitare aumenti di pressione sul tessuto, con rischio di danno neurologico.



L'unità neurovascolare mantiene costante il flusso tramite i fenomeni di

Autoregolazione (controllo macroscopico): **quando la pressione diminuisce le arteriole si dilatano, quando la pressione aumenta le arteriole si restringono**. In questo modo il flusso rimane costante a 50 ml/min in un range di pressione fisiologico, da 50 a 150 mmHg. Se la pressione scende oltre 50 mmHg, le arteriole collassano e si ha ischemia. Se la pressione aumenta oltre 150 mmHg, le arteriole si dilatano irreversibilmente, quindi si ha uno stravaso di fluidi.



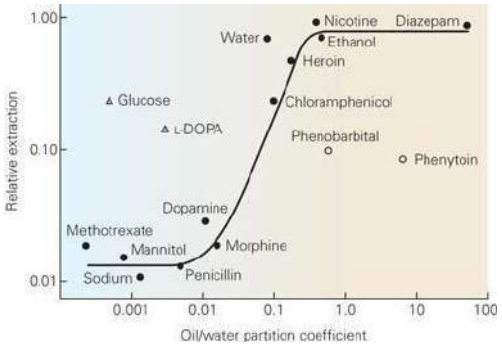
Iperemia (controllo microscopico): normalmente il sangue passa dall'arteriola alla venula senza riversarsi nel letto capillare. Se aumentano le esigenze metaboliche o se c'è danno al tessuto, si realizza **una vasodilatazione locale**, quindi il sangue si riversa nel letto capillare. E' il fenomeno alla base dell'imaging funzionale. Il controllo è realizzato da mediatori chimici e dal riflesso assonale.

Il concetto di unità vascolare nasce nel 2002, come cellule ematiche + parete dei vasi + matrice extracellulare + glia + neuroni. Ora si considerano anche periciti + microglia + glicocalice endoteliale

Alcune **BARRIERE** svolgono il ruolo di filtro selettivo tra sangue e SNC:

- **barriera emato-cerebrale**
- **barriera emato-retinica**
- **barriera tra sangue e liquido cefalorachidiano**

Le barriere sono costituite da cellule endoteliali connesse da tight junctions, inoltre i vasi sono circondati dai periciti. Molecole liposolubili attraversano liberamente la barriera, piccole molecole idrosolubili possono passare nello spazio pericellulare, grosse molecole idrosolubili hanno bisogno di un sistema di trasporto (trasportatori proteici, pompe a efflusso, transcitosi). Alcuni segnali chimici o traumi possono distruggere o ridurre l'espressione delle molecole delle tight junctions, determinando un aumento della permeabilità e quindi un danno al SNC. In alcuni casi si può indurre un aumento della permeabilità della BEE per somministrare dei farmaci (es. dopamina ai parkinsoniani). Coloranti e K+ possono passare dal plasma al muscolo, ma non al cervello.



Le tight junctions sono costituite da proteine di membrana per l'adesione cellula-cellula e da proteine che fanno da ponte tra le proteine di membrana e il citoscheletro.

Grafico dell'uptake al cervello in funzione del coefficiente di ripartizione olio-acqua: si ottiene una curva **sigmoide**. Tuttavia ci sono singole molecole al di fuori della curva principale, per cui esistono sistemi di trasporto specifici

- molecole idrofile, con coeff basso passano poco: coeff estrazione < 0.05

- molecole lipofile, con coeff alto passano molto: coeff di estrazione > 0.90
- alcuni farmaci lipofili (phenobarbital e phenytoin) hanno estrazione relativa bassa (0.10): si legano a proteine plasmatiche e attraversano difficilmente la BEE
- alcune molecole polari hanno estrazione relativa alta (> 0.10) grazie a trasportatori specifici (GLUT1 per il glucosio, cotrasporto sodio-glicina per gli aa, trasportatori per la levodopa…)

La BEE svolge il ruolo di barriera fisica e chimica. Ci sono enzimi specifici, come le AADC aminoacido aromatico decarbossilasi (levodopa →dopamina), le MAO monoamina ossidasi (dopamina→DOPAC)

La sinapsi glutammatergica o sinapsi tripartita è un esempio di unità neurovascolare: il glutammato che entra nel vallo sinaptico in parte viene ricaptato da astrociti (cellule gliali) tramite trasportatori EAAT1/2, viene convertito in glutammina (enzima glutammina sintetasi), che è trasferita al neurone pre-sinaptico, che può riutilizzarla.

Nel diabete si ha continua iperglicemia, che induce stress ossidativo. Tra le altre cose, si riduce la funzionalità dei trasportatori del glutammato, quindi i neuroni post-sinaptici sono over-stimolati. Il continuo ingresso di calcio attiva l'ossido nitrico sintasi, quindi NO contribuisce ad aumentare lo stress ossidativo. A lungo andare si ha l'attivazione della via delle caspasi e la **morte per apoptosi del neurone**. La retinopatia diabetica progredisce fino alla fase proliferativa, che può significare il distacco della retina e la perdita della vista.

RETINA E RETINOPATIE

La **RETINA** è una porzione di SNC localizzato in una struttura periferica. La retina è il tessuto con il più alto consumo di ossigeno in rapporto al suo peso. Ha bisogno di energia per:

- Continua liberazione di glutammato al buio
- Riconversione di 11-trans-retinale nella forma cis, per permettere l'associazione alle opine

La retina fa uso di due torrenti circolatori:

- **Circolo retinico**: irrora **tutte le cellule, tranne i fotorecettori**. L'arteria retinica capillarizza in 3 plessi: superficiale, intermedio e profondo. Possiede una **barriera emato-retinica interna** iBER, identica per struttura alla BEE.
- **Circolo coroideo**: irrora **solo i fotorecettori**. Si trova al di là dell'epitelio pigmentato. Possiede una **barriera emato-retinica esterna** oBER: i vasi sono pervi, ma le cellule dell'epitelio pigmentato possiedono tight junctions, quindi operano una selezione delle molecole che arrivano ai fotorecettori.

Nella retina esiste la sinapsi glutammatergica: le cellule gliali sono dette cellule di Mueller e assumono il glucosio tramite il co-trasporto sodio-glutammato. Il glutammato è convertito in glutammina e riciclato dal neurone pre-sinaptico.

La retina va incontro ad acidificazione:

- Il ciclo di Krebs libera CO_2 nei fotorecettori→le cellule dell'epitelio pigmentato EP convertono CO_2 in H^+ e bicarbonato, che rientra nelle cellule tramite il co-trasporto sodio-bicarbonato
- La glicolisi libera acido lattico nelle cellule di Mueller →trasportatori degli acidi carbossilici trasferiscono l'acido lattico nello spazio subretinico. I fotorecettori possono convertirlo a piruvato e riutilizzarlo, l'EP può inviarlo al sangue tramite co-trasporto H^+ / lattato.

Ipossia (carenza di ossigeno) o ischemia (carenza di ossigeno e glucosio) possono causare danno tissutale →rilascio di mediatori infiammatori → **ANGIOGENESI: produzione di nuovi vasi**. L'angiogenesi può essere compensatoria (cuore) o deleteria (retina). **I nuovi vasi sono leaky**, riversano altri mediatori infiammatori nel tessuto. In carenza di ossigeno aumentano le reazioni anaerobiche, quindi si ha produzione di acido lattico e abbassamento del pH.

Percezione della concentrazione di ossigeno: il recettore dell'O2 è **HIF hypoxia inducible factor**. E' un fattore di trascrizione dimerico (subunità alfa e beta), di cui esistono tre isoforme (HIF1, 2, 3). La subunità beta è continuamente prodotta ed è stabile, **la subunità alfa è continuamente prodotta, ma in presenza di ossigeno viene anche degradata**. Le proli-idrossilasi attaccano OH alle proline della subunità alfa, che viene riconosciuta dall'enzima VHL, ubiquitinata e degradata. **In assenza di O2 manca l'ossigeno per l'idrossilazione, la subunità alfa risulta stabilizzata** e può complessarsi con la beta. Altri segnali e altre modificazioni contribuiscono alla stabilizzazione di HIF. Quando è in forma dimerica HIF migra nel nucleo e riconosce delle regioni HRE hypoxia responsive elements a monte dei geni di cui regola la trascrizione. Si tratta di **fattori pro-angiogenici**.

- Glut-1: trasportatore del glucosio, per la produzione di energia
- VEGF vascular endotelial growth factor: stimola l'angiogenesi
- MMP: metalloproteasi di matrice, per fare spazio alla crescita dei nuovi vasi
- TGF-alfa fattore di crescita trasformante: stimola la proliferazione cellulare

Sono gli stessi fattori che si attivano durante lo sviluppo tumorale, quando il tumore solido supera il mm. Farmaci anti-VEGF si possono usare solo per pochi tipi di tumore, solo combinati ad altri farmaci.

- Fosforilazione ossidativa: 36 mol ATP / mol glucosio, in presenza di ossigeno
- Glicolisi: 2 mol ATP / mol glucosio, in assenza di ossigeno
- Glicolisi aerobica: 4 mol ATP / mol glucosio, nei tessuti non differenziati (tessuti attivamente proliferanti e tumori). Effetto Warburg: il 5% del piruvato va in fosforilazione ossidativa, il 95% in glicolisi.

Nell'uomo la vascolarizzazione della retina è già completa alla nascita. Nel topo il circolo retinico si sviluppa dopo la nascita, termina a 20-25 giorni. Gli astrociti sono in periferia, percepiscono la carenza di O2, producono VEGF**: i vasi sanguigni crescono dal centro della retina seguendo il gradiente di VEGF**.

Il termine RETINOPATIA prima faceva riferimento ad un danno non infiammatorio della retina, ai danni del microcircolo, spesso una manifestazione oculare di una malattia sistemica, come il diabete. Tutte le retinopatie hanno in comune una neovascolarizzazione anomala per cui i vasi che dovrebbero crescere lungo il piano della retina formano invece degli agglomerati che sporgono verso il corpo vitreo, a questi si possono attaccare dei corpi fibrosi, i quali per trazione portano a distacco totale o parziale della retina → cecità totale o parziale. Nel 2016 per retinopatia si intendeva un danno persistente o acuto della retina caratterizzato da infiammazione continua e rimodellamento vascolare, di cui il soggetto può non rendersi conto fino al manifestarsi del danno. Dal 2022 qualsiasi danno della retina che porta ad una riduzione visiva, la retinopatia spesso si riferisce a danni vascolari e danni dovuti ad un anomalo flusso sanguigno.

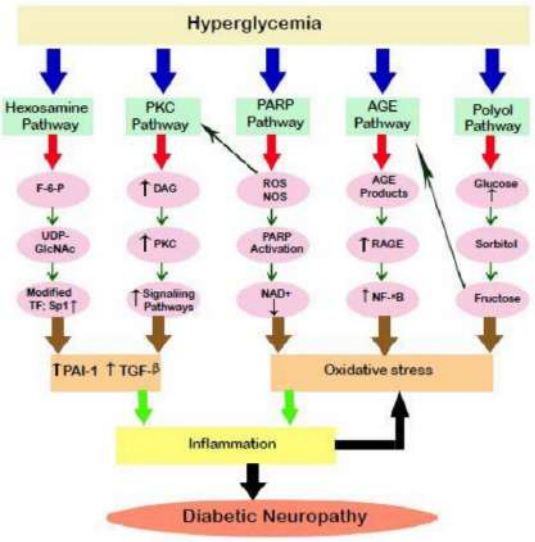
Un soggetto affetto da retinopatia ha una parziale cecità (si intende cecità legale, quindi anche soggetti ipovedenti): nel suo campo visivo ci sono delle macchie nere. A causa di problemi nella vascolarizzazione alcune porzioni della retina sono rimaste senza fotorecettori. Ci sono vari pathway che conducono alla retinopatia, con alcuni meccanismi comuni.

1- RETINOPATIA DIABETICA (DR)

Può insorgere dopo 15-20 anni di iperglicemia non trattata.

Tipo I – insulino dipendente	Tipo II – insulino indipendente
Malattia autoimmune che distrugge le cellule di langherans → non viene prodotta insulina	Viene prodotta insulina, ma i recettori sono insensibili (non espressione, non risposta)
Manifestazione precoce (diabete giovanile)	Manifestazione tardiva
Poco diffuso (10-20%)	Molto diffuso (80-90%)
Cura: somministrazione di insulina	Cura: attività fisica e dieta povera di zuccheri

Spesso insieme alla retinopatia diabetica si ha anche nefropatia diabetica. **In condizioni di iperglicemia si attivano vie metaboliche solitamente mantenute ad un livello minimo**=complicanze diabetiche. Le vie interagiscono tra loro: gli intermedi di ciascuna hanno effetto sulle altre. Il motivo per cui ai soggetti diabetici viene amputato un arto è che il sangue del diabetico è un mezzo di coltura ricco di glucosio che favorisce la proliferazione di batteri in ferite che data la mancanza di dolore si potrebbero anche non percepire. Diagnosi: già osservando il fondo della retina l'oculista ha degli indizi. Per una malattia avanzata, l'immagine che vede il soggetto è mancante in alcuni punti per la morte delle ganglionari o dei recettori.

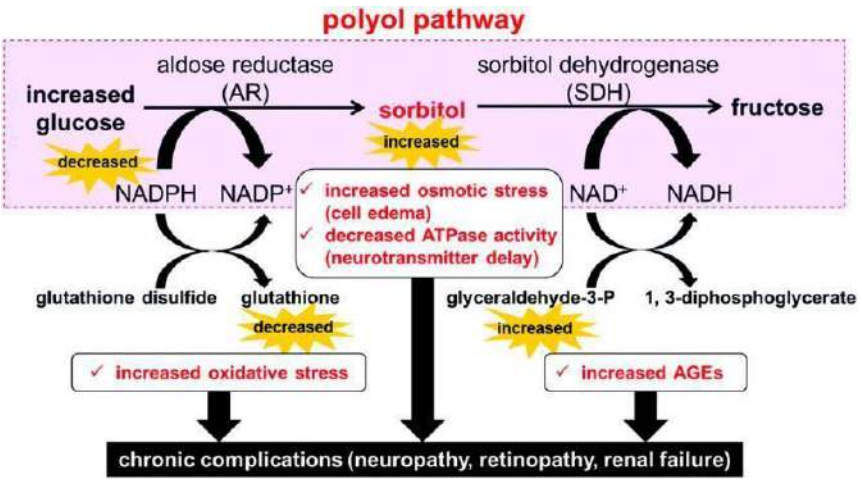


In ultima analisi i danni dovuti all'iperglicemia si esprimono a seguito di stress ossidativo e infiammazione. Perché il dibetico mangia tanto e dimagrisce? Il GLUT4, trasportatore del glucosio insulina-dipendente non funziona → il glucosio rimane fuori dalle cellule. Perché produce più urina del normale? I trasportatori renali del glucosio si saturano se la concentrazione ematica è alta → il glucosio è osmoticamente attivo, si tira dietro l'acqua. Le cellule insulina-dipendenti muoiono di fame pur essendo circondate da tanto zucchero (il quadro clinico di un paziente con diabete mellito non compensato è lo stesso di un paziente che fa digiuno prolungato e non smette → acidosi → coma → morte, la differenza è che nel secondo caso manca lo zucchero, nel primo le cellule non lo assorbono). Non tutte lo sono → quelle della retina hanno trasportatori indipendenti: se la glicemia aumenta, viene trasportato sempre più glucosio nella cellula.

Cosa succede in caso di iperglicemia:

A) Polyol pathway

Avviene nei tessuti insulino-indipendenti. Normalmente solo il 5% del glucosio prende la via dell'aldoso reduttasi (meno affine della esochinasi). In condizioni di iperglicemia l'esochinasi viene saturata, tutto il glucosio in eccesso prende questa via: glucosio → sorbitolo → fruttosio. Perché se percorsa troppo questa via è pericolosa, a tutti i livelli:



L'aldoso reduttasi sfrutta NADPH per una riduzione, mentre la sorbitolo deidrogenasi sfrutta NAD+ per una ossidazione.

Accumulo di sorbitolo → stress ossidativo, stress osmotico (edema cellulare), riduzione delle attività delle ATPasi (ritardo della trasmissione neurale)

Carenza di NADPH → la glutatione reduttasi non può riconvertire glutatione ossidato GSSG a glutatione ridotto GSH → stress ossidativo → distruzione di tutte le specie di macromolecole

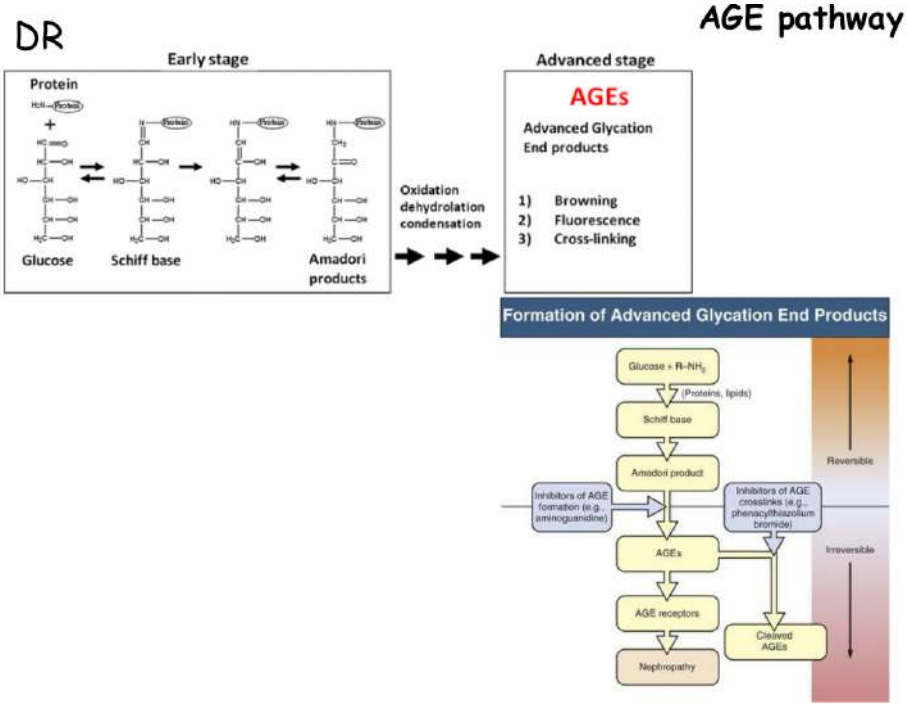
Accumulo sorbitolo (sorbitolo deidrogenasi tappa lenta più del lavoro della aldosio reduttasi) → il sorbitolo ha un potere osmotico maggiore di glucosio e fruttosio (consideriamo che negli epatociti il glucosio è immagazzinato come glicogeno anche per non farlo scoppiare) → accumulo acqua → stress osmotico → ridotta attività ATPasica → ridotta produzione Nt.

Carenza di NAD+ → accumulo di gliceraldeide 3 fosfato G3P, molecola altamente glicosilante → AGEs

Considerazioni sul glutatione: cofattore di enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS, come acqua ossigenata. Ci sono casi di stress ossidativo acuto in cui la capacità di ossidarsi del glutatione può essere

utile. Ci sono danni alle proteine creati sia da ROS che da RNS, alcune di queste modifiche sono irreversibili, ad esempio la nitrosidazione delle tirosine→ l'unico modo per riavere la proteina attiva è indirizzarle al proteasoma e risintetizzarle. Tutte le modifiche sulla cisteina sono reversibili, in particolare nelle proteine glutationinate → ponte disolfuro tra cisteina e GSSG → GSScys + GSH → in condizioni di stress ossidativo, se termina prima che l'ossidazione progredisca, potrà esserci un altro GSH che reagisce con quello legato alla cys → si riforma la proteina funzionale senza degradarla e risintetizzarla, che farebbe perdere energia.

B) AGE pathway (advanced glycation end products)



Proteine o lipidi esposti agli zuccheri possono subire **glicazione** (come la glicosilazione, ma casuale, non catalizzata da enzimi) e perdere il proprio funzionamento.

Parte del diidrossiacetone fosfato può entrare nella via del metilgliossale, pericoloso per la cellula perché interagisce con i gruppi amminici delle proteine, dà reazioni che ad un certo punto diventano irreversibili, frammenta la proteina dando gli AGE. In condizioni fisiologiche, metilgliossale → lattato → piruvato come nel pathway standard parallelo, ma uno degli enzimi che inizia la conversione, la gliossalasi, usa il glutatione → se non c'è, non si ha la detossificazione, ma una tendenza alla glicazione.

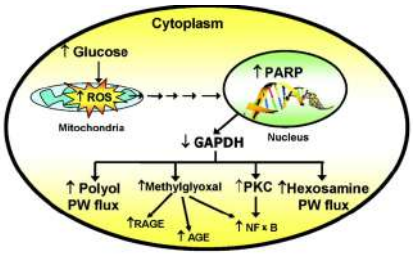
Se lo stress ossidativo finisce in tempo, la glicazione è reversibile. Carbonile glucosio + amminico proteina → base di Schiff → prodotti di Amadori →→ rotture catene, riarrangiamenti, condensazioni… → le reazioni diventano irreversibili e non si può più tornare indietro → liberazione AGE → attivazione recettori bersaglio, RAGE. Ad esempio nelle cellule gliali si ha iniziale infiammazione, che ha senso all'inizio per circoscrivere il danno → stress ossidativo → complicazioni vascolari, autoimmuni etc hanno tutte gli AGE ad un certo punto.

- Stato precoce: proteine + zuccheri → dicarbonili (Wolf pathway)
- Stato intermedio: dicarbonili + lipidi + zuccheri→ altri prodotti
- Stato tardivo: altri prodotti + proteine→ AGE. Perdita della funzionalità delle proteine, frammentazione, crosslink, risposta immune. Gli AGE rilasciati nello spazio extracellulare richiamano i macrofagi, che liberano citochine infiammatorie e fattori di crescita. Se la causa non viene rimossa, l'infiammazione acuta diventa cronica.

C) PARP pathway (poli-ADP-ribosio-polimerasi)

Lo stress ossidativo può causare danni al DNA. La PARP stimola gli enzimi di riparazione del DNA, sfruttando il NAD+. Produce ADP ribosio, inibitore della G3P deidrogenasi. La G3P si accumula, determinando:

- l'aumento degli AGE a partire dalla G3P deidrogenasi
- l'attivazione del PKC → stress infiammatorio
- via esosammina → fibrosi (che si attaccano poi ai grovigli vascolari e determinano il distacco della retina



D) PKC patwhay

Iperglicemia → + diacilglicerolo → + proteina chinasi calcio dipendente PKC (isoforme beta e delta)

- → - ossido nitrico sintasi endoteliale (per fosforilazione)→- NO → - effetto vasodilatativo, -uscita di sangue dal vaso
- → + endotelina 1 →+ spessore della membrana basale → riduzione del flusso sanguigno
- → + VEGF (fattore di crescita dei vasi, tipico prodotto retinopatie) →angiogenesi anomala + permeabilità→ stravaso di fluidi
- →+ TGF beta → fibrosi: deposito di collagene e fibronectina (matrice extracellulare → riduzione del lume dei capillari
- → + PAI 1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno) → fibrosi e occlusione dei vasi
- → + NF-kB → espressione dei geni proinfiammatori
- → Attivazione delle NAD(P)H ossidasi → produzione di ROS → stress ossidativo

E) Hexoamine pathway

Se è attivo il PARP → G3P deidrogenasi poco attiva → il fruttosio 6 fosfato entra nella via della esosammina.

Glucosio → glucosio 6 fosfato → fruttosio 6 fosfato + glutammina (glutammina:fruttosio 6P amminorasferasi GFAT)→ glucosamina 6P + UDP→**UDP-N-acetil-glucosamina6P**. L'OGT usa questo intermedio per modificare alcuni fattori di trascrizione, che inducono l'aumento della fibronectina e del TGF beta → fibrosi.

Visione classica delle retinopatie = la condizione di iperglicemia stimola processi che producono un danno microvascolare che daranno degenerazione e morte neuronale, visto che a parità di peso la retina è la porzione di SNC che consuma più ossigeno in assoluto. In realtà con tecniche di elettroretinografia, che misurano direttamente l'attività elettrica della retina, si vede che la neurodegenerazione precede il danno vascolare in molti casi. Cioè la neurodegenerazione non è effetto unicamente del danno vascolare, lo può precedere, e chiaramente il danno vascolare la fa peggiorare se già in corso. Anche viceversa, se muoiono i neuroni che consumano ossigeno, la concentrazione diventa momentaneamente sufficiente a sostenere quelli ancora funzionali → i vasi possono regredire aggravando ancora la situazione → aumentata produzione di VEGF a duplice azione:

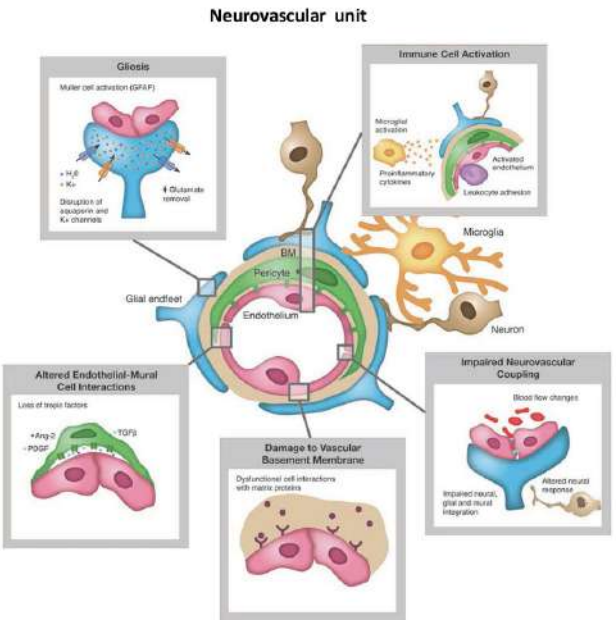
1) stimolo produzione vasi e permeabilità
2) neuroprotezione

Il VEGF vorrebbe essere protettivo e richiamare vasi, ma questi saranno ad aumentata permeabilità, quindi aggraveranno ancora la situazione.

Stadi della retinopatia diabetica:

- **Mild non proliferative DR**: neurodegenerazione e danno vascolare precoce, fenomeni di eccitotossicità e perdita di fattori neuroprotettivi→morte neuronale, disfunzione delle cellule gliali, infiammazione, breakdown della barriera ematoretinica, vasoregressione, alterazione del flusso ematico nella retina.
- **Severe non proliferative DR**: microaneurismi, punti emorragici sulla retina, lesioni vascolari sempre più estese, maculopatia
- **Proliferative DR**: produzione di VEGF, microangiopatia capillare e angiogenesi, formazione di vasi leaky, edema e produzione di grovigli di capillari che escono dal piano della retina, esercitano trazione e possono causare il distacco parziale o totale della retina. Per questo farmaci anti-VEGF sono parzialmente efficaci sugli effetti, ma non sulle cause.

UNITÀ NEUROVASCOLARE

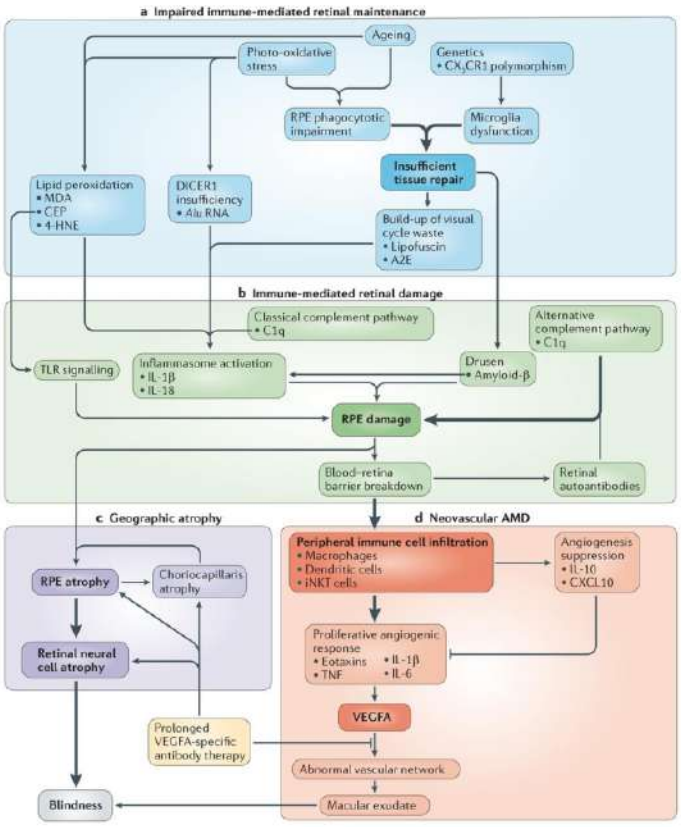


Il punto è che si sta alterando non solo una barriera tra vaso e neurone con endotelio e neurone, ma un intero complesso di cellule che interagiscono tra loro. Ad esempio nelle sinapsi glutammatergiche per evitare eccitotossicità si ha la partecipazione degli astrociti. il concetto di unità neurovascolare nasce circa 20 anni fa ad includere le altre cellule funzionalmente importanti: è vero che le tight junctions si formano tra gli endociti, ma è anche vero che esse si formano sotto stimolo dei periciti che circondano e stabilizzano il vaso. Ci sono anche le cellule microgliali con funzione fagocitica → il danno al complesso si riflette in ultimo ai neuroni.

Nel caso si giungesse all'ultimo stadio, con collasso della barriera ematoretinica, bisognerebbe operare per togliere l'edema: **vitrectomia**. Con due aghi, uno che tritura e aspira l'edema, e l'altro che, per non far collassare l'occhio se si aspira umor vitreo gelatinoso, lo sostituisca (con un materiale artificiale che poi sarà rimpiazzato fisiologicamente con umor vitreo), dando una pressione intraoculare giusta (o collasso o glaucoma). Non è detto che sia risolutivo, perché se la barriera è alterata è probabile che l'edema si riformi. Se il problema sono i vasi, si fa **fotocoagulazione laser** dei vasi. **Iniezioni intravitreali** di anti VEGF.

2- <u>DEGENERAZIONE MACULARE LEGATA ALL'ETA' (AMD)</u>

Il principale fattore di rischio per l'AMD è l'età: l'incidenza aumenta progressivamente oltre gli 80 anni.



Stress ossidativo, processi infiammatori → accumulo di depositi (proteine misfolded, lipidi…) nella coroide → attivazione sistema immunitario →produzione di fattori infiammatori.

L'AMD coinvolge principalmente l'epitelio pigmentato, quindi la **barriera emato-retinica esterna**: stress ossidativo, reazioni immunitarie, accumulo di proteine misfolded, processi infiammatori… Si ha <u>accumulo di</u> componenti come l'amiloide, detti drusen.

Forma secca o atrofia geografica: atrofia delle cellule dell'epitelio pigmentato e dei fotorecettori

Forma umida o neovascolare: <u>proliferazione dei vasi leaky della coroide nella retina</u>, che risulta danneggiata

E' possibile passare dalla forma secca alla umida, raramente il contrario.

3- RETINOPATIA DEL PREMATURO (ROP)

Il principale fattore di rischio è la **nascita prematura**: la retina si forma nelle ultime 2-3 settimane di vita. Il secondo fattore è il **peso**: un bambino oltre 1200 g in genere non sviluppa ROP. La malattia è comparsa "a picchi": dopo la 2^GM, dopo il miglioramento della qualità delle cure, dopo gli investimenti sanitari nei paesi in via di sviluppo. Nei paesi più sviluppati sta comparendo la ROP aggressiva, una malattia che salta gli stadi normali della retinopatia: si manifesta nei bambini molto prematuri (20-22 settimane), senza lasciare tempo di intervenire.

Cosa succede fisiologicamente? La retina si sviluppa a gravidanza completa, 39 settimane. Durante lo sviluppo, inizia dalla papilla del nervo ottico, i vasi arteriosi iniziano a vascolarizzare e poi si spostano verso la periferia, grazie ad un'impalcatura di astrociti, che invadono preliminarmente la perifieria retinica → inducono le cellule retiniche a produrre VEGF → le cellule endoteliali retiniche lo sentono e crescono verso la fonte di VEGF.

Il problema si ha se il bambino nasce pretermine, la retina sarà tanto immatura quanto più prematura è la nascita. Intorno alla 34-36 settimana, indipendentemente dal momento della nascita, si sviluppa la retinopatia. Perché? Il feto si sviluppa nell'utero materno, quindi in un ambiente ipossico. L'emoglobina fetale riceve l'ossigeno da quella materna, riesce a strappargliela perché ha una subunità gamma più affine → lo scambio è circa al 70%. Il punto è che la pressione parziale di ossigeno negli alveoli è circa 100 mmHg, quella atm è 21% di 760 mmHg, 159 mmHg → anche dove l'emoglobina è satura al 99%, la ppO_2 è minore → vale per tutti i tessuti interni umani, anche nell'utero. Il prematuro, quando nasce, si trova in un ambiente ad altissima pp di O_2, cosa aggravata dalle incubatrici. Anche nelle cellule non vascolarizzate, la ppO_2 è così alta che l'ossigeno entra per diffusione nelle parti periferiche → relativa iperossia → riduzione o regressione vascolare!

Quindi, le cellule periferiche ricevono poco ossigeno, vanno in condizione di ipossia, quindi producono VEGF. Si crea un gradiente che guida lo sviluppo di vasi sanguigni dalla macula cieca verso la periferia. Se si arriva alla 39° settimana di gravidanza la retina è completamente formata, altrimenti no. **Alla nascita il bambino passa da un ambiente ipossico ad uno ricco di ossigeno**. Le cellule smettono di produrre VEGF, quindi i vasi cessano di crescere. Il bambino però continua a crescere, quindi anche l'occhio: **ad un certo punto le cellule senza vasi percepiscono nuovamente l'ipossia, riprendono la produzione di VEGF**, che causa una produzione improvvisa e confusa di vasi. Nel 30% dei casi i grovigli crescono verso l'umor vitreo e possono determinare il distacco della retina (retinopatia proliferativa). Nella maggior parte dei casi invece si ha una stabilizzazione e una regressione spontanea della patologia. Possono tuttavia insorgere problemi della vista nel periodo della pubertà. I fattori coinvolti sono VEGF e **IGF (fattore permissivo per VEGF)**: VEGF cresce rapidamente, mentre IGF cresce gradualmente. Quando IGF è basso non si manifestano effetti, quando IGF cresce si ha retinopatia proliferativa.

Quindi si ricade sempre in un'iperproduzione di VEGF, per motivi diversi. In genere l'80% dei bambini guarisce spontaneamente, mentre però il 20% è a rischio di cecità totale o parziale. In realtà anche quando va in regressione spontanea porta ad una maggiore incidenza di astigmatismi etc.

Normalmente la ROP si sviluppa in **5 stadi**:

0- Nascita prematura, i vasi della regione centrale della retina cessano di proliferare
1- Compare una linea di demarcazione tra zona vascolarizzata e non vascolarizzata
2- La linea si inspessisce
3- L'occhio cresce, i vasi riprendono a crescere, proliferano verso il vitreo.
Si può intervenire chirurgicamente o con farmaci anti-VEGF
4- Distacchi parziali della retina, parziale cecità
5- Distacco totale della retina, cecità

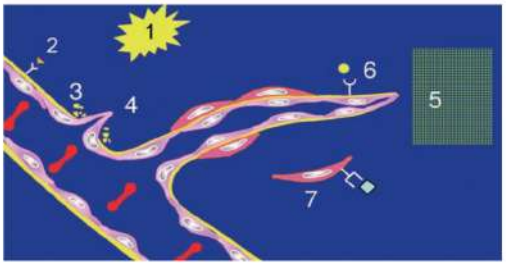
NEOVASCOLARIZZAZIONE

Tutte le retinopatie hanno in comune la **neovascolarizzazione, che è un fenomeno angiogenetico**. I nuovi vasi possono essere leaky, quindi aumentare lo stravaso e l'infiammazione. Se crescono al di fuori del piano della retina, nel corpo vitreo, possono esercitare trazione e determinare il distacco della retina.

La formazione di nuovi vasi può avvenire per:

Vasculogenesi: precursori delle cellule endoteliali + stimoli chimici (primissime fasi di sviluppo)
Angiogenesi: proliferazione di cellule endoteliali di vasi già esistenti (dove interviene VEGF, stimola la proliferazione di cellule endoteliali inizialmente non perfuse, poi il vaso si canalizza e viene percorso dal sangue, serve che i vasi abbiano una parete completa perché siano funzionali al 100%).

Un livello basale di angiogenesi è fisiologico (riparazione dell'endometrio e delle ferite, dopo ischemia), ma livelli troppo bassi o troppo alti di angiogenesi sono associati a patologie (infertilità, ischemia, cancerogenesi, retinopatia)



1. Triggering of an angiogenic switch
2. Stimulation of angiogenic growth factor receptors on vascular endothelial cells
3. Proteolysis of basement membrane and extracellular matrix
4. Proliferation and migration of vascular endothelial cells
5. Invasion
6. Stabilization and maturation of new vessels
7. Recruitment of enveloping pericytes and smooth muscle cells

L'angiogenesi è innescata da segnali di ipossia come VEGF e da segnali infiammatori come IL-8, TGF beta, TNF alfa. Una cellula in ipossia o danneggiata produce questi fattori, che legano recettori sulle cellule endoteliali. Queste proliferano e migrano seguendo il gradiente, intanto producono proteasi che degradano la matrice. Periciti e cellule muscolari si riorientano, rendendo il vaso stabile, pervio e funzionale. Nella fase di crescita del nuovo vaso è possibile individuare delle **tip cells**, delle cellule dotate di pseudopodi e ricche di recettori per il VEGF, VEGFR-2, che guidano la crescita del vaso.

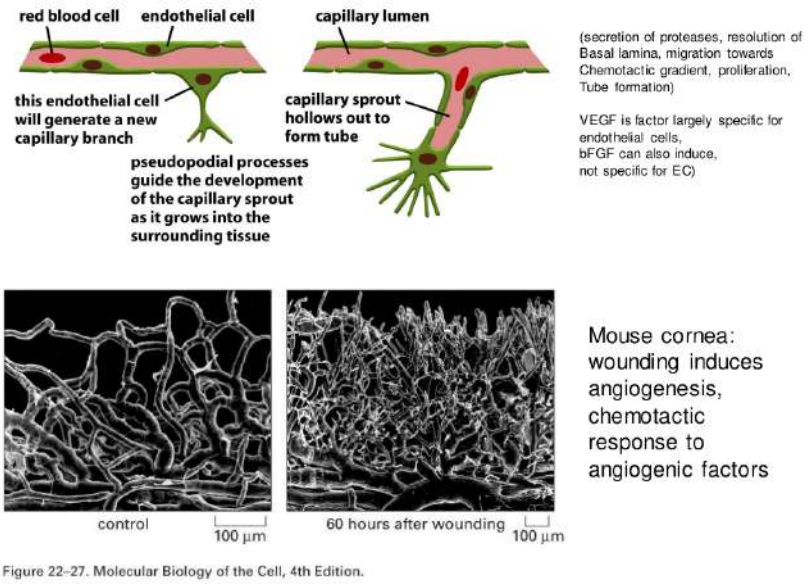


Figure 22-27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Qualsiasi sia la causa dell'ipossia (cellula tumorale in un tumore solido ad es), c'è un momento iniziale comune in cui si producono i fattori della famiglia HIF, in particolare **HIF-1**. È un fatttore di trascrizione che ha centinaia di geni, tra cui VEGF. Tutti i geni servono a sopravvivere a scarse concentrazioni di ossigeno. Se la produzione di VEGF è eccessiva, non stimola vasi funzionali ma vasi che peggiorano la situazione.

Come si regola la quantità di HIF in base all'ossigeno?

I fattori HIF sono composti da due subunità, alfa e beta, la beta comune a tutti e tre i fattori HIF, costitutivamente espressa. La subunità alfa viene continuamente prodotta e continuamente degradata → importanza di avere sempre pronto un meccanismo per contrastare carenza di ossigeno! Se i livelli di HIF aumentano nel giro di pochi minuti → si ha un danno così potenzialmente catastrofico che vale la pena pagare dell'energia perché la cellula sia sempre pronta all'evenienza. Quando è presente l'ossigeno, le

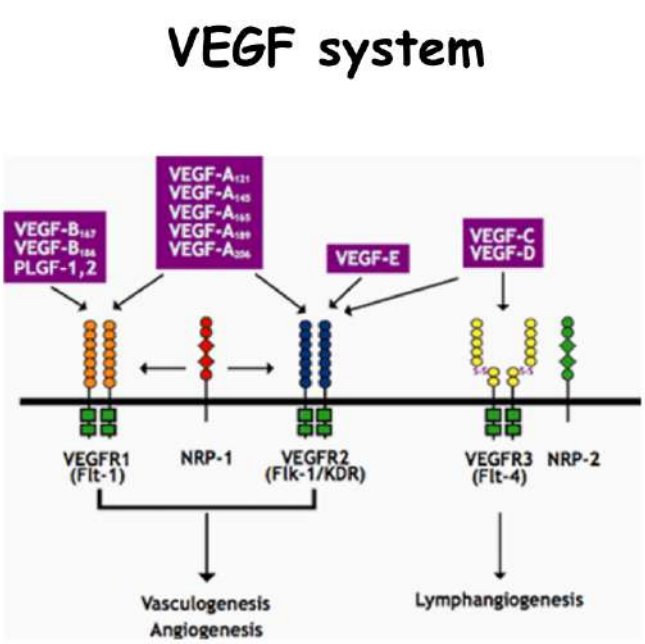
prolilidrossilasi usano come co-substrato l'ossigeno per idrossilare proline di altri substrati proteici, tra cui 2 residui di prolina nella subunità alfa (nel citoplasma, migra nel nucleo solo in condizioni di ipossia) quando c'è ossigeno a disposizione. La subunità alfa con le proline idrossilate viene riconosciuta dalla proteina di Von-Hippel Lindau (**VHL**) che è una ubiquitina ligasi → piccoli numeri di ubiquitine legate regolano l'attività di una proteina, mentre oltre un certo numero le inviano al proteasoma → in caso di presenza di ossigeno si ha un livello basale prossimo allo zero di trascrizione da parte di HIF. In condizioni ipossiche → no idrossilazione → no degradazione → stabilizzazione HIF dimerico → attività trascrizione HIF:

- MMP = geni delle metalloproteasi della matrice
- VEGF
- Glut-1 = serve glucosio, con poco ossigeno la produzione di ATP avviene per glicolisi, che ha resa minore della fosforilazione ossidativa
- TGFalfa
- tutti gli enzimi della via glicolitica

  →→ sono tutti volti a creare nuovi vasi per nutrire i tessuti

  →→ effetto Warburg nelle cellule tumorali, shift metabolismo da ossidativo ad anaerobico: il metabolismo è così rapido che serve energia subito, rapidamente.

SISTEMA DEI VEGF



Esistono varie molecole identificate come **VEGF**, dalla A alla F. Quelli di interesse per l'uomo sono VEGF A, B, C, D e il PLGF placental growth factor. Quando si parla di VEGF si intende VEGF-A, isoforma a 164 aa (VEGF-E in alcuni virus, VEGF-F nel veleno di alcuni serpenti) Ci sono varie isoforme (8 per VEGF-A, alcune anti-angiogeniche): le isoforme più corte sono solubili, quelle più lunghe sono legate alla matrice. Quando le proteasi degradano la matrice si ha ulteriore liberazione di VEGF, che prima era legato. Il sistema è così complesso che esistono isoforme di VEGF-B_{xxx} che sono fattori anti angiogenesi.

VEGF agisce legandosi ai **recettori VEGFR**, (i geni umani sono Flt, e se uso il nome del gene mi riferisco al recettore umano, altrimenti sto parlando del recettore di qualsiasi specie in generale) recettori ad attività tirosin-chinasica. Si vede che ci sono fattori che legano selettivamente alcuni recettori → se voglio stimolare solo un recettore, ad esempio, posso usare quello specifico.

Il livello di attivazione è modulato dalle **neuropiline**. NRP-1 per VEGFR-1,2 e NRP-2 per VEGFR-3. L'attività è esplicata attraverso la via delle MAP chinasi e produce una serie di effetti: aumento della proliferazione cellulare e della permeabilità di membrana, riorganizzazione dei filamenti di actina.

- **VEGFR-3**: è associato all'angiogenesi dei vasi linfatici (che evitano gli edemi dando drenaggio)
- **VEGFR-1**: ha affinità 10 volte maggiore rispetto a VEGFR-2, ma ha attività chinasica 10 volte minore. Esiste anche in forma solubile, si origina dal recettore di membrana che va incontro a idrolisi della parte legata al signalling. Ha funzione di sequestrare il VEGF, e di membrana, che attiva debolmente i processi angiogenetici. In condizioni fisiologiche tutto il VEGF lega solo VEGFR-1
- **VEGFR-2**: ha affinità bassa, ma attività molto alta. Quando VEGF cresce e satura VEGFR-1, allora

inizia a legare VEGFR-2, stimolando fortemente i processi angiogenetici.
Il VEGFR-2 è quello maggiormente coinvolto nell'angiogenesi, se considero VEGF-A, dato che il VEGFR-2 ha meno affinità ma attività chinasica maggiore, in condizioni fisiologiche, il VEGF lega R1, anche in parte a quello solubile. Quello che si lega al solubile è intrappolato e ininfluente, quello che si lega al recettore di membrana inoltre dà inizio ad una trasduzione debole → si ha un mantenimento basale piuttosto debole della segnalazione. In condizioni di ipossia, i livelli di VEGF aumentano, saturano i VEGFR-1 → legano VEGFR-2 che fa aumentare l'angiogenesi in questo modo. Tutte le vie di signalling coinvolte convergono sulla produzione di nuovi vasi, ad esempio stimolate le vie angiogenetiche e inibite quelle apoptotiche → è un sistema che si autoalimenta da un certo momento in poi. Tra i fattori proangiogenici anche **angiopoietina-2**.

Al VEGF si affiancano i fattori di crescita dei fibroblasti FGF e delle piastrine PDGF, che stimolano la proliferazione dei periciti e delle cellule dello strato basale.

TRATTAMENTO DELLA RETINOPATIA

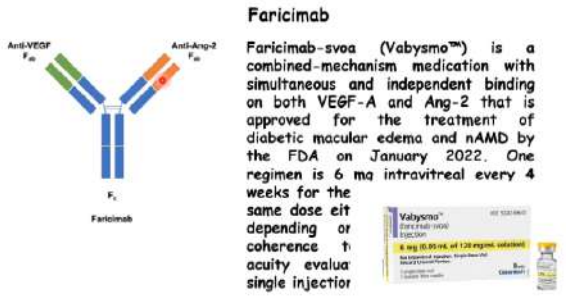
Fino a 15 anni fa l'unico approccio era la terapia chirurgica tramite **fotocoagulazione laser**: i grovigli di vasi vengono bruciati con il laser, che cauterizza immediatamente la ferita. Problemi: di base, si interviene in uno stadio molto avanzato, quindi non si ha l'idea di far regredire la malattia; molto spesso si riformano nuovi grovigli di vasi→ sono necessari interventi continui, quindi a lungo andare la retina si copre di cicatrici e la vista è persa comunque. Si potrebbe pensare ad un'iniezione intravitreale a rilascio lento di cortisone, che però andrebbe fatta ogni 6 mesi.

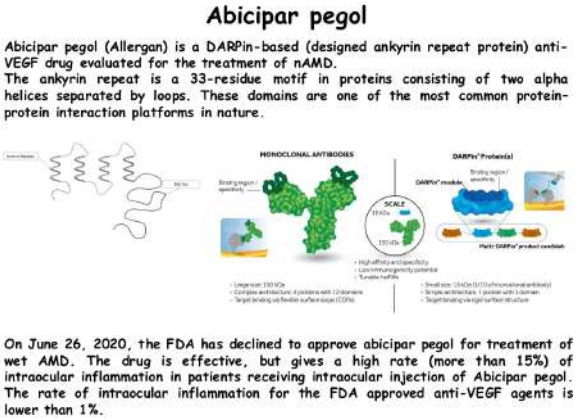
Per intervenire sulla causa, e non sull'effetto, sono stati proposti dei **farmaci anti-VEGF**, per impedire la crescita dei vasi. Funzionano sequestrando il VEGF: (annotiamo le compagnie farmaceutiche perché il fatto che grandi compagnie investano in questi farmaci è segno della diffusione del problema)

A) Avastin (Bevacizumab di Roche): Ig intere (149 kDa), approvato per il trattamento di tumori. Sviluppato per primo da Napoleone Ferrara (italiano emigrato a San Diego, fonda una start up poi acquisita da Novartis, per cui poi produce (B). L'idea di Judah Folkman, che ha sempre sfiorato il Nobel, è che impedendo il nutrimento dei tumori con i vasi si riuscisse ad ucciderli, cosa che in realtà non basta), molto economico. La somministrazione di Ig intere nell'umor vitreo può risultare complicata, e possono diffondere meno.
B) Lucentis (Ranibizumab di Novartis): anticorpo monoclonale, fragment antigen binding (50 kDa), approvato per il trattamento di edema maculare diabetico, ma può essere usato anche in altre patologie, dato che alla base c'è sempre VEGF. Sviluppato per secondo, nella speranza che le piccole dimensioni aumentassero la velocità di diffusione e quindi l'efficacia. In realtà non si ha un miglioramento significativo, ma il costo è 16 volte maggiore, 1 iniezione 1600 euro → investigazione sulla probabilità che fosse fatto un cartello tra aziende e medici (in Italia infatti il trattamento è coperto dal sistema sanitario nazionale).
C) Macugen (Pegaptanib di Pfizer): aptamero (RNA a 28 bp che lega VEGF) a basso peso molecolare coniugato al PEG, che lo rende pesante come il Lucentis e di difficile impiego. Approvato per il trattamento della degenerazione maculare senile.
D) Eylea (Aflibercept di Bayer): proteina ricombinante che unisce i domini di legame di VEGFR-1 e VEGFR-2. Ampiamente usato per tutte le retinopatie. Uno dei più recenti e utilizzati, si vede che non si è pensato al peso molecolare, ma all'affinità per il VEGF in tutte le isoforme.
E) Beovu (Brolucizumab di Novartis): frammento anticorpale di basso peso molecolare che lega tutte le isoforme di VEGF, approvato per la degenerazione maculare senile neovascolare, approvato off-target. In commercio in Europa da due anni. Dall'Eylea in poi, si sta cercando di pensare cicli di iniezioni non mensili ma trimensili, per abbassare la compliance del paziente.
F) Vabysmo (Faricimab di Genentech), da pochi mesi sul mercato italiano e europeo, si è cercato sempre di allungare i tempi tra un'iniezione e l'altra, ma si è anche andati oltre. Ci sono pazienti con

retinopatia diabetica non rispondent. Ipotesi più probabile è che c'entri il fatto che hanno livelli di VEGF che non sono particolarmente alti, mentre lo sono quelli di altri fattori proangiogenetici → anticorpo bifunzionale che lega anche l'angiopoietina-2.

G) Abicibar pegol (di Allergan): farmaco con ripetizioni ad ankirina, ingengerizzati per legare VEGF. È tra i farmaci non approvati perché dà tassi di infiammazione intravitreale intorno al 15%, quando quelli approvati sono sotto l'1%.





L'impiego di farmaci anti-VEGF ha una serie di limitazioni:

- Può parzialmente curare, ma non prevenire. Solo in certi casi si ha un miglioramento della vista.
- Più l'intervento è tardivo, minore è l'effetto. Può rallentare la patologia, ma non risolverla.
- In certi casi, in seguito ad interruzione di trattamento, i farmaci risultano inefficaci (re-bound)
- Nel 20-30% dei casi i farmaci sono inefficaci, perché non è VEGF il fattore responsabile
- L'anti-VEGF può entrare in circolo e causare danni ai soggetti ischemici
- Il VEGF ha anche funzione di neurotrofico e neuroprotettivo
  Esperimento del 2007: danno da ischemia ottenuta legando l'arteria retinica di topo → si riprende la perfusione alla retina di topo → compaiono delle cellule apoptotiche (test di Tunel, valutazione frammentazione DNA). Con esperimenti di doppia marcatura si dimostra che non sono cellule endoteliali né gliali, ma neuroni a morire. Nello stesso esperimento somministrando VEGF-A in un'isoforma diversa dalla 164 si osserva una diminuzione dose-dipendente dei neuroni apoptotici → si dovrebbe forse (domanda ancora aperta) mantenere un optimum di VEGF.
  A lungo andare i farmaci anti-VEGF potrebbero quindi creare danni neuronali, ma sono difficili da valutare perché i pazienti sono anziani.

ROP

La retinopatia del prematuro ROP si tratta allo stadio 3 con fotocoagulazione laser oppure con farmaci anti-VEGF. Si può usare anche il **propanololo**, ora sostituito da **beta-bloccanti** più efficaci e sicuri. Il propanololo era usato per problemi cardiovascolari, e casualmente si è visto che era molto efficace nella riduzione dell'emangioma, un tumore benigno dei vasi sanguigni. Il 5-10% dei neonanti presenta emangioma, mentre è più comune nei nati prematuri. Subito dopo la nascita si ha una proliferazione esponenziale dei vasi sanguigni, che si stabilizza ad un anno di vita e poi progressivamente regredisce. In rari casi gli emangiomi possono causare danni alla cute e agli organi interni. Prima si trattava con antitumorali, cortisone e interferone (terapie molto pesanti).

Il propanololo è un antagonista impuro dei recettori beta-adrenergici. A basse concentrazioni non lega i beta, ma i v [controllare].

- **Beta1**: mediano la vasocostrizione. Sono rappresentati principalmente nel cuore (bersaglio ideale per curare le ischemie o ipertensione), ma anche in altri distretti

- **Beta2**: mediano la vasodilatazione e il rilassamento della muscolatura liscia
- **Beta3**: mediano la lipolisi nel tessuto adiposo bruno, il rilassamento dei cardiomiociti e della muscolatura liscia coronoaria (ottimo target per terapie cardiache), il rilassamento del muscolo detrusore della vescica.

Si è ipotizzato un meccanismo di azione a 3 livelli per il propanololo:

- nel breve periodo induce vasocostrizione⟶ decolorazione dell'emangioma
- nel medio periodo inibisce la produzione di VEGF⟶blocco della crescita dei vasi
- nel lungo periodo induce l'apoptosi delle cellule endoteliali⟶regressione dell'emangioma

Accertato che **il propanololo riduce i livelli di VEGF**, bisogna capire se può essere usato come terapia per la ROP. Si usa un modello di topo OIR, trattato in questo modo

1-7 gg: normossia (20% di O2) per garantire la corretta vascolarizzazione del centro della retina
7-12 gg: iperossia (75% O2) per mimare il passaggio dall'utero all'ambiente esterno
Dopo 12 gg: normossia, che a questo punto è relativa, per mimare la condizione di ipossia a cui vanno incontro le cellule dell'occhio non vascolarizzate⟶ angiogenesi incontrollata

Nella fase di ipossia si osserva un'up-regolazione post-traduzionale dei recettori beta3, a livello dei nuovi vasi. Il propanololo ha bassissima affinità per i recettori beta3. Somministrando il propanololo si ha una riduzione dose-dipendente del VEGF in eccesso. Viene mantenuto un livello fisiologico di VEGF, anche se il propanololo è somministrato al topo di controllo => il propanololo agisce solo sulle vie patologiche.

Il propanololo riduce l'espressione di HIF-1 alfa, quindi riduce la produzione di VEGF, riducendo l'angiogenesi e la proliferazione di vasi leaky. VEGF aumenta infatti la permeabilità dei vasi: ridurre il VEGF ripristina i livelli di occludina, una proteina delle tight junctions, quindi **i vasi risultano stabilizzati** (visibile misurando i livelli di albumina nel siero e nel parenchima retinale, oppure utilizzando il colorante blue di Evans che può rimanere confinato nei vasi o stravasare se il vaso è leaky).

Il propanololo è stato approvato per un trial clinico di trattamento della ROP in stadio II per via orale, nei casi in cui non ci sia un'alternativa valida. Il trial è durato dal 2009 al 2013 e ha coinvolto 52 bambini. Il trial ha dimostrato che il propanololo è efficace (sono regrediti in fase III 18/26 trattati vs 9/25 non trattati [controllare]), ma può avere effetti collaterali (agendo sui recettori beta2 del polmone può causare delle apnee)

Per aumentare la sicurezza del propanololo si propone la somministrazione oftalmica (collirio), che però è poco efficace: solo il 5% del farmaco raggiunge la retina. Si sviluppano quindi colliri con nanoparticelle o composti muco-adesivi per aumentare l'efficienza. Si autorizza un secondo trial clinico su 55 bambini con ROP in stadio II. 19 vengono trattati con 0,1% propanololo e 5 progrediscono nella malattia, quindi il trial viene interrotto. Nel topo però si era usata una dose al 2%. Si autorizza un terzo trial clinico su 96 bambini con ROP in stadio I. Meno di 6 casi progrediscono nella malattia, quindi si procede con lo stadio II e si termina lo studio. Il trial dimostra che il farmaco è efficace e sicuro.

ALZHEIMER DISEASE (AD)

E' una **malattia neurodegenerativa**. Ci sono **forme ereditarie, genetiche** (10%) con insorgenza precoce (anche 40 anni), ma la maggior parte (90%) è **sporadica**, con l'età come maggior fattore di rischio: l'esordio è a 65-70 anni ed è comunissima oltre gli 80-85 anni.

La diagnosi di AD è difficile: PET e risonanza magnetica possono aiutare a identificare le aree funzionanti, la dilatazione dei ventricoli, l'atrofia cerebrale. Nelle demenze vascolari (AD non genetico) i vasi si chiudono, i neuroni non ricevono nutrimento, quindi degenerano. Spesso l'AD è unita ad altre forme di demenza dovute all'invecchiamento. La diagnosi certa di AD si può fare solo post-mortem, osservando le lesioni caratteristiche: **placche amiloidi senili e grovigli neurofibrillari**.

Fattori di rischio:

1. Età
2. Sesso: rischio femmine > rischio maschi
3. Allele codificante per una apolipoproteina: rischio del 29% in soggetti con isoforma ApoEε4, rischio del 9% in soggetti con altri aplotipi. Non è un marcatore, ma aumenta il rischio.
4. Traumi cranici: rischio aumentato
5. Carenza di acido folico e vitamina B12: ridotta protezione dallo stress ossidativo, ma comunque rimane un'associazione statistica e la connessione precisa non è nota.
6. Elevati livelli plasmatici di omocisteina (è un fattore di rischio anche per disturbi cardiovascolari)
7. Storia familiare di demenze: possibile componente genetica
8. Basso livello di scolarizzazione: se il cervello ha sviluppato poche sinapsi, il danno dell'AD si manifesta molto più rapidamente rispetto ad un cervello con molte sinapsi (perché si ha un substrato minore? È un'ipotesi)
9. Basso reddito e basso livello occupazionale (dipendono dalla bassa scolarizzazione)

Fattori di protezione:

- Alto livello di istruzione
- Moderato consumo quotidiano di vino rosso ed elevato consumo di pesce con Omega 3 (antiossidanti)
- Alcune popolazioni hanno minore incidenza di AD, forse a causa di fattori genetici o ambientali
- Statine: abbassano il livello di colesterolo, quindi la saturazione dell'apolipoproteina E

L'aspettativa di vita in seguito a diagnosi di AD è tra 2 e 20 anni, con media di 8 anni. Non si muore di AD, ma delle complicanze correlate, soprattutto patologie respiratorie. **L'AD non si può curare**, ma se trattata (con farmaci e terapie di socializzazione) **si può rallentare**. La progressione dell'alzheimer va dal declino cognitivo lieve, al moderato, al severo (mild, moderate, severe). Il trattamento delle fasi precoci costa meno del trattamento delle fasi tardive.

Si può ipotizzare l'AD quando l'anziano manifesta problemi in memoria, linguaggio, capacità di calcolo, orientamento nello spazio e nel tempo, attenzione, capacità di esprimere giudizio. Il neurologo effettua il **MMSE (mini-mental state examination).** Se il punteggio è inferiore a 25 su 30 la diagnosi di AD è molto probabile. Minore è il punteggio, più grave è la patologia, indicativamente. E' un test estremamente specifico per alzheimer, con un'approssimazione al 96% si fa una corretta diagnosi presuntiva, quindi ha una buona specificità, ma è molto poco sensibile, infatti c'è un cutoff, ma non possiamo individuare le differenze tra i singoli punteggi, lasciando una serie di demenze precoci tra i punteggi più bassi che non si possono distinguere. Ne esistono altri che permettono di valutare la capacità di condurre una vita quotidiana senza problemi. Esistono una serie di standardizzazione in base all'età e al grado di scolarizzazione del soggetto.

I casi di alzheimer genetico sono stati fondamentali per identificare le vie metaboliche coinvolte nella malattia, che sono le stesse responsabili degli alzheimer sporadici. Sicuramente esistono altre vie e altre connessioni tra le vie, oltre a vari fattori ambientali. Si trasmette in modo complesso (non c'è un singolo o unico meccanismo che giustifichi l'ereditarietà), eterogeneo (vari polimorfismi e mutazioni in geni multipli con fattori non genetici), dicotomico (sono mutazioni rare, altamente penetranti, trasmesse come dominante-autosomico). Considerare l'albero genealogico è importante anche perché l'età di insorgenza in

realtà potrebbe variare, anche se il cut-off per determinare sporadico/genetico è posto a 65 anni.

Le **mutazioni** sono rare, spesso caratteristiche per famiglia, altamente penetranti, trasmesse in maniera autosomica, dominanti. Se ne conoscono molte, soprattutto a carico di 3 geni: **presenilina1, presenilina2 e precursore della proteina amiloide APP**. Queste mutazioni causano l'alzheimer precoce.

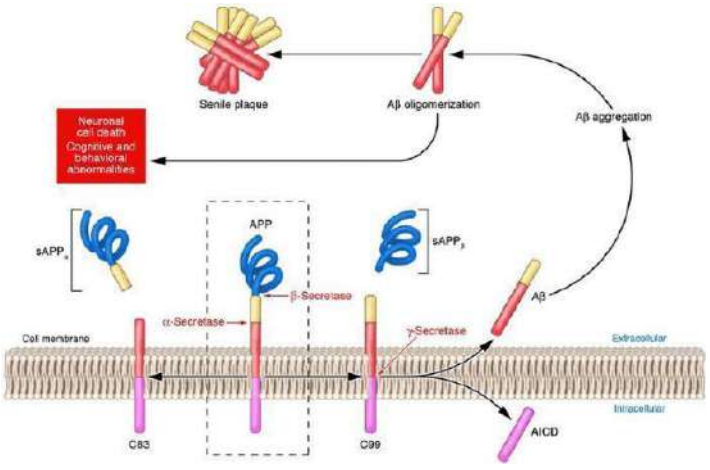
Anatomia microscopica post-mortem si basa su riduzioni di peso e volume dell'organo, dilatazione cavità ventricolari, ampliamento solchi e scissure della corteccia, atrofia, e poi anche considerazioni su lesioni caratteristiche dell'ippocampo: **placche senili** (non tipiche dell'alzheimer, ma molto più diffuse) e **grovigli neurofibrillari** (precipitati di proteina tau che inizialmente rendono il neurone distrofico, e poi rimangono come precipitati extracellulare quando il neurone degenera) .

Le **PLACCHE SENILI** sono **depositi amorfi di peptide beta-amiloide**. Il peptide beta-amiloide è una forma insolubile derivante dall'APP (proteina precursore dell'amiloide), che forma microfibrille (7-10 nm)→ oligomeri→filamenti→infine precipita sotto forma di placca **nello spazio extracellulare**. Le placche possono avere un denso nucleo centrale e inglobare anche altre molecole, proteiche e non. Il deposito di placche è un processo comune nell'invecchiamento, ma nel caso di AD è molto maggiore. Le placche si visualizzano con precipitazione argentica o PET funzionale e possono essere:

- **Classiche**: accumuli extracellulari, con un nucleo centrale di beta-amiloide, circondato da un anello di neuroni distrofici, microglia e astrociti
- **Diffuse**: forma preliminare delle placche classiche, in aree cerebrali non sintomatiche dell'AD
- **Bruciate**: un nucleo isolato di amiloide

La proteina precursore dell'amiloide **APP** è costituita da oltre 700 aa, è una proteina (non specifica dei neuroni) transmembrana con vari domini, si ritiene in generale che abbia funzione nella comunicazione cellula-cellula. Nella sua forma matura viene metabolizzata da due secretasi, secondo due vie fisiologiche:

A) **Via non amiloidogenica** (neuroni, piastrine)
La maggior parte dell'APP viene idrolizzato dall'**alfa-secretasi**→un peptide solubile sAPPalfa nello spazio extracellulare + un peptide C83 che rimane nella membrana. C83 viene idrolizzato dalla **gamma-secretasi** (un complesso che comprende presenilina 1 e 2) → frammento rosso in figura solubile extracellulare + frammento AICD che agisce da fattore di trascrizione intracellulare. Non c'è produzione di molecole tossiche.

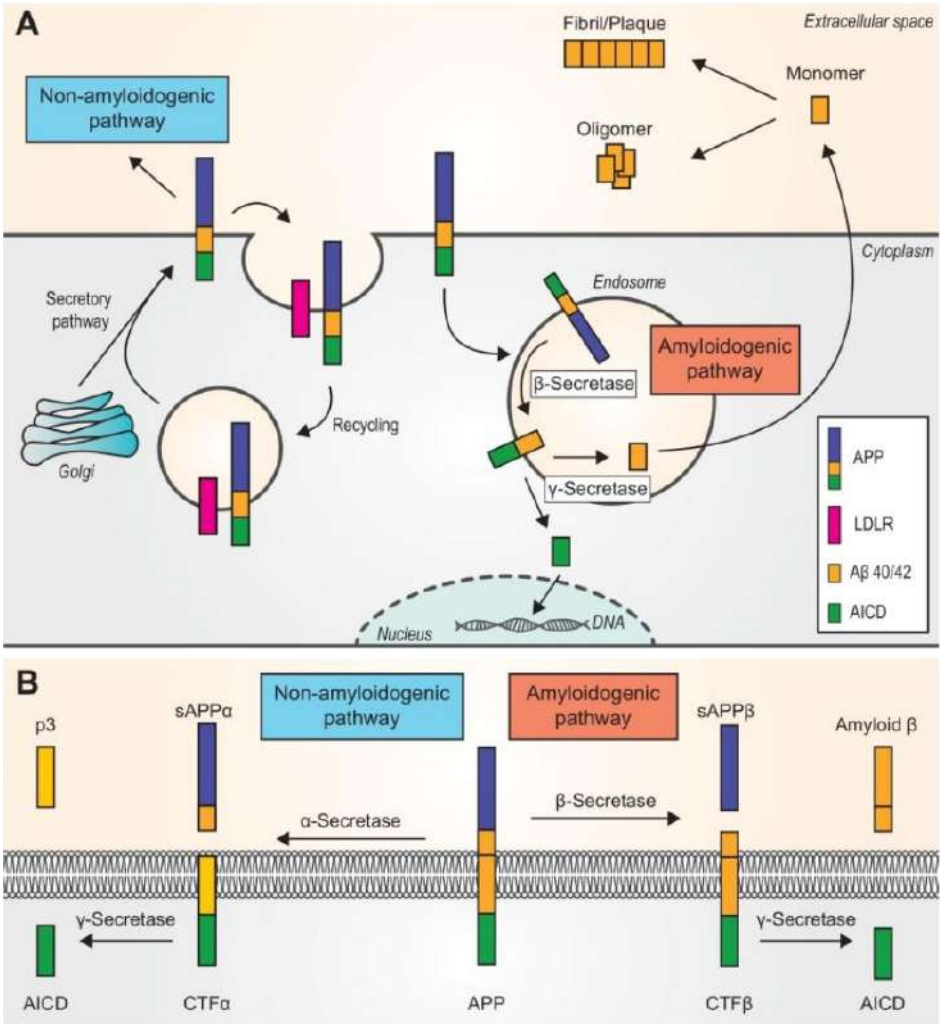


B) Via amiloidogenica
Una parte minoritaria di APP viene idrolizzata dalla **beta-secretasi** (in realtà non sono tanto enzimi quanto attività enzimatiche, in questo caso l'enzima principale è BACE-1)
→ il peptide di membrana C99 è più lungo, viene idrolizzato dalla **secretasi gamma** → peptide AICD rilasciato nel citosol + peptide amiloide-beta rilasciato nello spazio extracellulare.
La pericolosità di A-beta è legata alla sua lunghezza: a seconda del momento in cui avviene l'idrolisi di APP, si possono produrre forme più corte a 39-40 aa, che non sono tossiche.

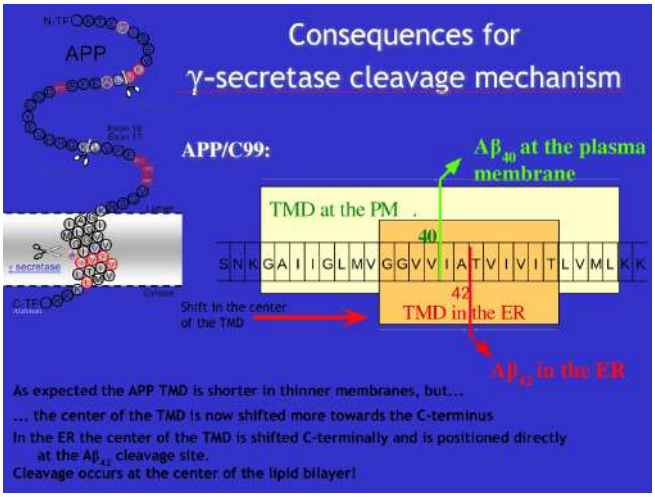
La forma lunga (42-43 aa) è poco solubile e tende ad aggregare in oligomeri → fibrille → aggregati → precipitano dando le placche senili. La forma più tossica non è come si credeva, la placca senile, ma l'oligomero, che è in grado di interagire con tutta una serie di recettori di membrana.

- RAGE (end points della glicosilazione → stress ossidativo)
- NMDA
- Recettori acetilcolina.

Le placche senili sono viste come un tentativo ultimo di ridurre la tossicità degli oligomeri tramite precipitazione.



L'inserimento di APP nella membrana avviene attraverso una serie di fasi: prima nella membrana assonale, poi in maniera retrograda nel corpo e nei dendriti. Se APP è idrolizzato sulla membrana, in generale segue la via non amiloidogenica. **Se APP è idrolizzato precocemente (a livello del RER o di vescicole) si genera la forma lunga tossica (42 aa)**. Se APP è idrolizzato tardivamente si genera la forma corta non tossica (39-40 aa). Si vede che le mutazioni rilevanti sono o nel peptide Abeta, oppure a cavallo dei siti di idrolisi, e fanno aumentare l'attività della gamma-secretasi verso la produzione di catene a 42 aa.

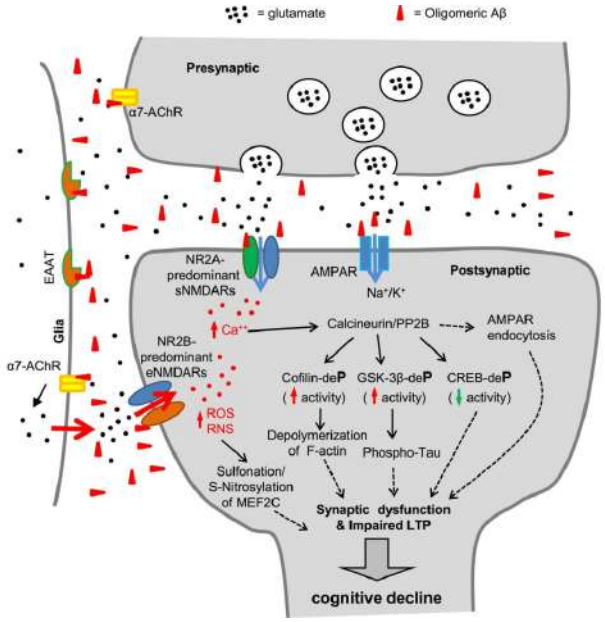


Membrana plasmatica dà 90% non tossico; se l'idrolisi è più precoce, nel RER, si ha quasi esclusivamente peptide tossico.

Questo shift è determinato dal diverso spessore delle membrane cellulari (dovuto al contenuto di colesterolo), che porta la gamma-secretasi a riconoscere siti diversi sulla proteina. La gamma-secretasi idrolizza il legame peptidico che si trova a metà dello spessore di membrana → in una membrana tardiva, questo è tra aa40 e aa41 → crea Abeta 40. Quando la membrana è più precoce ha uno spessore più ridotto, ma non in modo simmetrico sui due lati, perché il colesterolo aumenta lo spessore più verso l'esterno che l'interno → nella zona centrale della membrana si ha aa42-aa43.

Quali sono le conseguenze della produzione del peptide tossico:

1. Interazione con i trasportatori del glutammato delle cellule gliali → inattivazione → no ricaptazione glutammato → aumento concentrazione nel vallo sinaptico + aumento apertura recettori ionotropici per glutammato → eccitotossicità per glutammato →→ aumento processi apoptotici
2. Interazione recettori alfa7 dell'acetilcolina nelle cellule gliali presinaptiche → li blocca → meno responsive all'acetilcolina → deficit colinergico accoppiato a eccessivo glutammato.



La forma tossica del peptide è prodotta, anche se in piccola parte, anche in maniera fisiologica. **Ci sono quindi dei meccanismi in grado di rimuoverla**:

- Apolipoproteina E: può legare e rimuovere l'amiloide beta, trasporta il colesterolo ma può legare anche Abeta, legare il recettore per le lipoproteine del neurone stesso che ha prodotto gli Abeta, e il complesso recettore per le lipoproteine-Abeta-ApoE viene internalizzato, e destinato a degradazione lisosomiale/per transcitosi la vescicola nel lato apicale passa verso la membrana basolaterale, per poi essere lasciata nel liquido cefalorachidiano e infine nel sangue.
- Formazione delle placche: probabilmente la placca non è la causa della patologia, anzi è un sistema tampone per rimuovere fibrille e oligomeri solubili, che sono gli elementi dannosi. L'aggregazione è stimolata da ApoE e ACT
- Clearance: altre proteine come l'alfa-macroglobulina possono legare l'amiloide beta e riportarlo nei neuroni che producono APP. Qui l'amiloide viene degradato, oppure trasncitato nel liquido cefalorachidiano e poi nel plasma
- Degradazione: proteasi aspecifiche come la tripsina e altre proteasi specifiche riconoscono i complessi amiloide ad esempio IDE (enzima che degrada l'insulina), o uno ancora più specifico, neprilisina.
- Attivazione delle cellule gliali: attivazione fagocitica di microglia e astrociti →riconoscimento e fagocitosi dell'amiloide. Si induce uno stato di gliosi reattiva, che è a tutti gli effetti un'infiammazione → partecipa al danno neurodegenerativo.

Meno del 10% dell'amiloide-beta è la forma lunga tossica. Il rischio di accumulo si ha quando delle mutazioni determinano un aumento della produzione o una diminuzione della rimozione del peptide. Nel caso di Alzheimer sporadico la causa di accumulo non è ancora nota, probabilmente si tratta di stress ossidativo, processi infiammatori e riduzione dei processi di rimozione.

GROVIGLI NEUROFIBRILLARI sono **aggregati di proteina Tau anomala, poco solubile, che precipitano all'interno delle cellule**. Se non vengono correttamente degradati nei proteasomi, gli aggregati si accumulano. In seguito alla formazione di precipitati il neurone diventa distrofico e muore, quindi i grovigli vengono liberati nell'ambiente extracellulare. Vengono evidenziati con la colorazione con Sali d'argento.

I grovigli si trovano principalmente nei neuroni piramidali dell'ippocampo e della corteccia fronto-temporale e causano una **perdita della memoria recente**. Quando la malattia progredisce i grovigli raggiungono la neocorteccia e iniziano a depositarsi nello spazio extracellulare.

La proteina **Tau lega le subunità di tubulina, stabilizzando i microtubuli**. E' coinvolta nella crescita dell'assone e nel trasporto assonale delle vescicole. Tau possiede numerosi stadi di fosforilazione: la sua attività dipende dal bilanciamento di attività chinasiche e fosfatasiche. **Quando tau è iperfosforilata si dissocia dai microtubuli**, li destabilizza → si disaggregano → inizialmente problemi nel trasporto assonale, degenerazione microtubulare → degenerazione dell'assone → morte del neurone.

(Non vediamo i segni precoci della malattia, ma ci sono delle forme di proteine amiloidi che si possono identificare nella retina, prima del cervello, e hanno il vantaggio di essere anche visibili nel paziente in vita; anche anosmia, anche nel Parkinson).

Due lesioni caratteristiche: quale viene prima? C'è una connessione casuale?

Teoria tauista: a monte la destabilizzazione di microtubuli, a valle l'alterato metabolismo di APP
Teoria battista: a monte l'alterato metabolismo di APP, a valle la destabilizzazione dei microtubuli
Modello seriale: l'accumulo di amiloide beta induce l'iperfosforilazione di tau
Teorie intermedie: i due processi si influenzano vicendevolmente, rafforzandosi
Modello dual pathway: i due processi sono indipendenti, ma hanno gli stessi effetti a valle

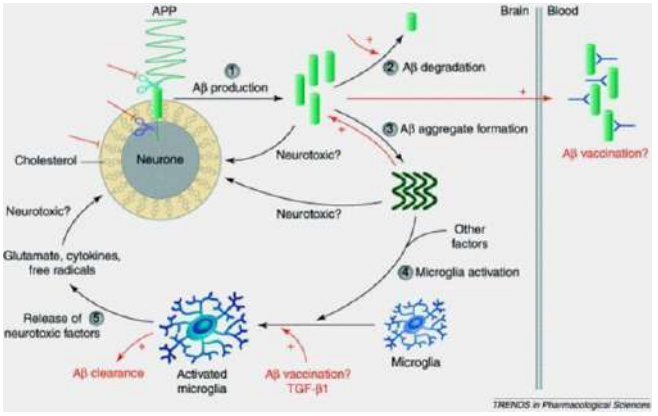
Ci sono evidenze a supporto di tutte le ipotesi. Se ci sono alterazioni genetiche nei meccanismi coinvolti nella rimozione dell'amiloide beta, questo aumenta il rischio di sviluppare Alzheimer. Il numero delle placche amiloidi, però, non sempre correla con la severità della malattia → se fosse la causa principale dovrebbe essere così. Questo fa supporre che il problema non sia tanto l'amiloide beta, ma più la presenilina1/2 (attività enzimatiche della gamma-secretasi).

Ci sono più evidenze a supporto della teoria battista: le mutazioni a carico della proteina Tau non causano mai l'Alzheimer, ma il Parkinson, e questi soggetti mostrano grovigli neurofibrillari, ma non placche senili. Quindi sembra che a monte ci sia la formazione di placche, anche se in realtà non c'è correlazione tra la quantità di placche e la gravità della malattia. Inoltre gli effetti di accumulo delle placche di amiloide non sono replicabili in vitro.

Non sono noti i fattori scatenanti di un Alzheimer sporadico. Possibili fattori di rischio per lo sviluppo della patologia: alluminio, metalli di transizione, agenti infettivi, anomalie sinaptiche, deficit immunitari, mancanza di fattori di crescita, eccesso di lipoproteine, accumulo di proteine misfolded.

Ipotesi di trattamento:

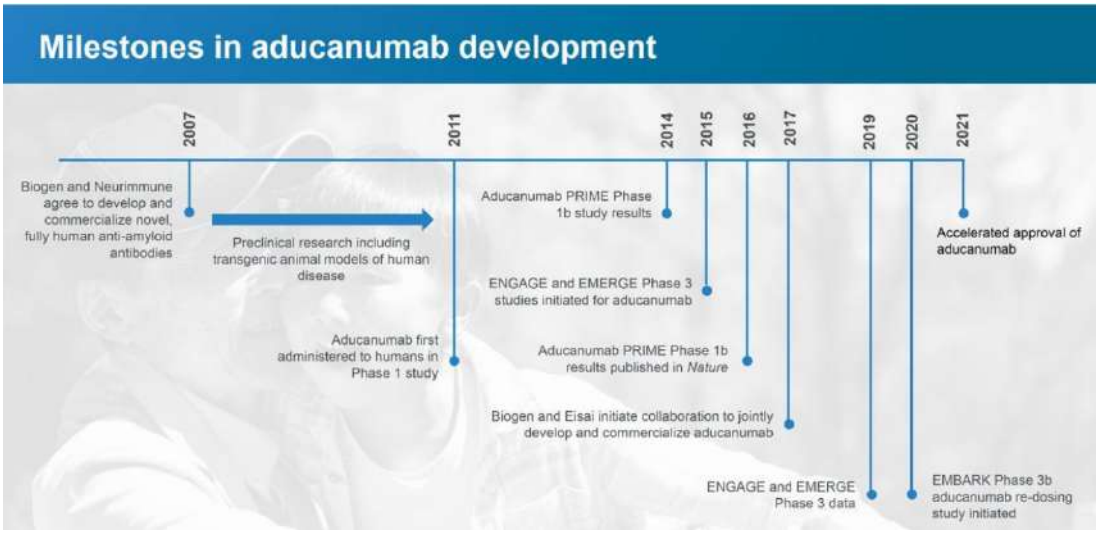
- Dieta ricca di antiossidanti o farmaci anti-infiammatori per combattere lo stress ossidativo
- Inibitori delle colinesterasi per permettere all'acetilcolina di rimanere più a lungo nel vallo sinaptico, stimolando maggiormente i neuroni rimasti
- Antagonisti dei recettori NMDA (memantina) impediscono l'eccessiva liberazione di glutammato
- Strategie che agiscono sull'accumulo di amiloide: inibizione della beta-secretasi, prevenzione dell'oligomerizzazione (tramite agenti chelanti di rame e zinco, che però servono anche alla superossido dismutasi, quindi si intaccano le difese contro lo stress ossidativo), allontanamento dell'amiloide dal tessuto cerebrale (riduzione del colesterolo tramite statine per liberare l'apolipoproteina E), farmaci anti- infiammatori,



stimolazione della microglia

- Ipotesi di vaccinazione contro l'amiloide beta

Da qualche anno sono in commercio anticorpi monoclonali contro l'amiloide beta: **Aducanumab**



Chiaramente servirà un campione molto ampio per capire se funzionerebbe per tutti i pazienti.

Si è cercato di individuare dei **marcatori precoci dell'AD**. Un marcatore ideale dovrebbe:

- Essere evidenziabile prima della morte, meglio se nelle fasi precoci
- Essere specifico per l'AD e modificarsi con l'andamento della malattia o della terapia
- Essere rilevabile con tecniche semplici, non invasive, riproducibili, economiche

Possibili marcatori:

1. Livello assoluto di amiloide beta 42 aa: valido durante l'insorgenza, ma quando il soggetto entra in AD il livello di APP si abbassa, probabilmente proprio per la formazione delle placche senili
2. Livello assoluto di amiloide beta 40 aa, oppure il rapporto fra amiloide beta 42 aa e 40 aa: se la forma lunga aumenta, la forma corta dovrebbe ridursi, quindi il rapporto aumentare.
   L'amiloide beta si può misurare con prelievi di sangue o con tamponi salivari. Modificatori plasmatici di amiloide beta possono mobilizzare il peptide dalle placche senili e facilitarne la liberazione a livello plasmatico.

3. Livello di APP. Il gene dell'APP si trova sul chr 21 (i Down sono un modello di Alzheimer, perché hanno un sovradosaggio di APP che determina forme di demenza)
4. Rapporto tra le due forme dell'APP, ad alto e a basso peso molecolare
5. Proteina Tau

6. GFAP glial fibrillary acidic protein: è una proteina del citoscheletro delle cellule gliali, che indica che queste cellule stanno esercitando attività fagica, forse proprio sugli accumuli di amiloide. E' un marcatore non specifico, liberato in seguito alla morte di queste cellule.
7. Citochine, marcatori di stress ossidativo, livelli di molecole antiossidanti, omeostasi del colesterolo

8. Aumento dell'attività della beta-secretasi, in particolare dell'enzima BACE (si può misurare nelle piastrine). Non correla con il punteggio MMSE
9. Diminuzione dell'attività dell'alfa-secretasi, in particolare dell'enzima ADAM10. Più APP prende la via amiloidogenica
10. Mutazioni nei geni di presenilina 1 e 2, che codificano per componenti della gamma-secretasi

---

Esistono dei modelli animali per lo studio dell'Alzheimer: servono per fare studi molecolari e in certi casi anche studi comportamentali.

Topo: vantaggi legati alla vicinanza tra topo e uomo, limitazioni legate alle restrizioni sulle sperimentazioni. In genere si usano knock-out o knock-in per proteine specifiche della patologia
Lampreda (P. marinus): possiedono neuroni giganti con cui è facile lavorare, esprimono le stesse proteine umane, ma non sviluppano placche e grovigli, l'anatomia è sostanzialmente diversa
C. elegans: utile per l'isolamento di geni ortologhi, per valutare gli effetti delle mutazioni
D. melanogaster: organismo rapido e versatile, senza restrizioni alle sperimentazioni. Vie metaboliche abbastanza conservate, possibilità di fare test comportamentali

Produzione di un topo transgenico: il gene umano dell'APP mutato, posto sotto il controllo di un promotore forte (PDFG), è iniettato nelle cellule uovo che vengono poi fecondate. Esistono ormai decine di modelli, alcuni con mutazioni singole, alcuni con mutazioni multiple. L'istopatologia nel topo è estremamente simile a quella nell'uomo.

Test comportamentali:

- Morris water maze: vasca opacizzata, con una piattaforma sotto il pelo dell'acqua → quanto tempo il topo impiega a raggiungere la piattaforma collocata sotto il pelo dell'acqua. Ripetendo il test, il topo wt diventa via via più veloce (memoria dei segnali fuori dalla piattaforma, la richiama), il topo demente no.
- Y maze: un tubo a Y, con un braccio contenente del cibo. Il topo wt ricorda quale braccio contiene il cibo, il topo demente sceglie in maniera casuale, non ricorda la ricompensa.
- Radial arm maze: si basa sulla curiosità e la metodicità del topo. Esplorazione di una struttura con vari bracci. Il topo demente esplora in maniera caotica.
- Novel object recognition: quanto tempo spende il topo in presenza di due oggetti da esplorare. Il topo wt esplora preferenzialmente l'oggetto nuovo (in termini di percentuale di tempo di esplorazione), il topo demente sceglie in maniera casuale.

Non sempre quello che si ottiene dal modello animale è direttamente traslabile sull'uomo: era stata proposta la **vaccinazione contro l'Alzheimer**, iniettando un peptide amiloide beta a 42 aa, una volta al mese per 11 mesi. L'organismo produce anticorpi contro il peptide tossico. Nel modello murino che esprimeva APP umana si è osservata una diminuzione significativa delle placche senili (effettivamente era quel peptide e non un altro casuale). Si ritiene che gli anticorpi prodotti stimolino e incrementino l'attività di scavenging. L'immunizzazione si è mostrata efficace sia nel prevenire la malattia, sia nel bloccarne il peggioramento. Nell'uomo il tentativo di immunizzazione non ha mai avuto successo, quindi le sperimentazioni sono state bloccate. L'immunizzazione rimane come approccio per frenarne l'avanzata, anche se non per impedirne la comparsa.

26/09

Risultati a favore di due teorie diverse sulle connessioni tra periferia e centri della percezione del gusto.

1) Modello della linea marcata (come nella coclea): tanti neuroni diversi ciascuno rispondente a uno stimolo e ritroviamo la stessa organizzazione in tutte le stazioni delle vie uditive (membrana basilare con spessori diversi per suoni diversi)

Teoria dell'incrociarsi delle informazioni (come nella retina, con tre tipi di colori nei coni): grande sensibilità della periferia.

Il flavour si definisce aroma.

Neuroni bimodali: gusto, vista (presentazione), tatto (consistenza)

5 MODALITA' GUSTATIVE

La sesta modalità sensoriale che verrà definita è quella degli acidi grassi: ci sono evidenze sui recettori metabotropici (GP40, CP36 e GP120) degli acidi grassi, la cui percezione sembra simile a quella del dolce. I gatti mangiano il gelato volentieri nonostante non sentano il dolce. Altre modalità sensoriali sono state proposte, come quella del piccante (capsaicina). Questa però è legata a uno stimolo termico. Anni fa si parlava della modalità delle bevande gassate. Insomma, le cinque modalità attuali non sono esaustive.

I dolcificanti non utilizzano sempre la stessa via di percezione degli zuccheri naturali.

Amaro: più di mille sostanze anche non alcaloidi. Diversamente che per il dolce, siamo in grado di valutare le sfumature dell'amaro (es: il luppolo nella birra), che infatti piace a volte e altre volte no. Tanti recettori per l'amaro.

Le cellule recettoriali sono uni o bi modali? Sono unimodali, ma con una complicazione.

Cellule di almeno quattro tipi diversi nei bottoni gustativi, con sottotipi (tipo 2 dolce - umami - amaro (26 diverse sottocategorie)).
Le cellule di tipo 1 sono circa la metà delle cellule totali: impalcatura, metabolismo ATP, percezione del salato
Nella porzione basolaterale delle cellule di tipo 2 non troviamo vescicole di neurotrasmettitore o macchinari SNARE: rilasciano ATP ma non attraverso vescicole, ma da canali.
Le cellule di tipo 3 sono le uniche con un apparato presinaptico (sono dette presinaptiche).
Le cellule di tipo 4 sono le staminali adulte.

Come avviene la trasduzione? L'ATP rilasciato dalle cellule di tipo 2 può sia legare i neuroni primari esprimenti P2X che cellule presinaptiche esprimenti i P2Y, modulando la secrezione di serotonina. In realtà però i recettori purinergici espressi dal neurone primario hanno un ruolo importante (se KO niente percezione): il funzionamento non è del tutto chiaro. Lo stesso ruolo presinaptico delle cellule di tipo 3 è stato elucidato relativamente da poco.

La stimolazione di cloruro di potassio serve per discriminare le cellule recettoriali da quelle presinaptiche. Una volta distinte due cellule e compreso che appartengono alle due classi si vede a cosa rispondono. Le cellule recettoriali rispondono alla cicloeximide, le cellule presinaptiche anche al saccarosio, al mono glutammato di sodio e all'acido citrico e al sale. Le cellule recettoriali sono unimodali quindi (solo cicloesimide: amaro), mentre le cellule presinaptiche sono plurimodali.
Guardiamo le stesse cellule al microscopio usando marcatori per cellule presinaptiche e recettoriali: il colorante sensibile al calcio colora sia le cellule recettoriali che le presinaptiche, mentre un colorante per la PLC beta due colora solo le cellule recettoriali. Possiamo rifare lo stesso usando invece come marcatore SNAP25, che si localizza solo nelle cellule presinaptiche, cioè quelle sensibili al KCl. Sulla base del fatto che le cellule di tipo 3 quindi si accendono sempre, il modello proposto è allora quello di cellule di tipo 2 che percepiscono amaro, dolce e umami e che poi attivano le cellule di tipo 3 rilasciando ATP. Questo modello però non è davvero stato provato. Prima si pensava che le cellule di tipo 3 percepissero anche il salato, che invece è recepito dalle cellule di tipo 1.

Le cellule di tipo 2 e 3 hanno recettori per precise modalità sensoriali e rilasciano neuromodulatori, ma sono una fonte ricchissima di neuromodulatori (es: glucagone, calanina, colecistochinina) liberati anche al livello enterico e rilasciati in certe aree cerebrali dove agiscono come Nt. Hanno anche recettori per i modulatori che esse stesse rilasciano: la stimolazione gustativa non accende una via semplice che risulta in "dolce", ma attiva un sistema di modulazione del segnale che fa pensare che queste stesse cellule possano produrre sostanze capaci di regolare, ad esempio, il metabolismo idrosalino ed energetico. Il

gusto quindi non ha solo un valore edonistico, perché la sua percezione ha a che fare con processi metabolici che non hanno a che fare con la percezione cosciente del sapore.

I recettori per il salato sono prevalentemente dei canali Enac, simili a quelli del tubulo distale che regolano il riassorbimento facoltativo del sodio. Le caratteristiche dell'ansa di Henle disgiungono il riassorbimento di acqua e sodio, che viene riassorbito nella branca discendente. La maggior parte (95%) del sodio è riassorbita in questa sede, sul cloruro di sodio rimanente si può giocare nel tubulo distale sulla base delle esigenze idrosaline: l'aldosterone stimola il riassorbimento di questo sodio quando c'è bisogno di acqua, che viene riassorbita con il sodio, altrimenti perso nelle urine. Questo avviene perché vengono espressi i canali Enac, inibiti dall'amilorìde. Non sono gli stessi identici canali espressi nei bottoni sinaptici: la famiglia è la stessa ma la subunità è diversa. I canali Enac sono espressi anche nella porzioni basolaterale: le dimensioni degli ioni sono tali da riuscire a oltrepassare le giunzioni strette e bagnare quindi le porzioni basolaterali. Sulla membrana basolaterale ci sono anche dei canali del potassio e dei canali del potassio sensibili al calcio (percezione di potassio e calcio). In generale l'entrata di sodio depolarizza la cellula e media l'entrata di calcio da canali voltaggio-dipendenti con il rilascio dell'ATP. Lo stesso tipo di meccanismo basato sulla depolarizzazione è quello della percezione dell'acido. La saliva acidificata determina l'apertura dei canali PKD2L1 per il sodio e il calcio, con conseguente depolarizzazione. Un altro possibile recettore coinvolto è un canale al potassio, normalmente aperto, che si chiude in risposta all'acidificazione della saliva.

Anche i protoni potrebbero depolarizzare la cellula, ma acidificando il citoplasma: allora si pensa che ci siano canali sensibili ai protoni ma che fanno passare (o meglio, che non fanno più passare) il potassio.

Il dimero T1R1 - T1R3 percepisce l'umami
Il dimero T1R2 - T1R3 percepisce il dolce (i felini hanno perso T1R2).

I T2R agiscono prevalentemente in forma omomerica (ma anche in omo ed etero dimeri).

La subunità alfa di tutte le proteine G associate a questi recettori è la gusducina, che è chiamata così perché inizialmente trovata nei bottoni gustativi, anche se sono presenti anche al livello dell'intestino. Quando la subunità alfa si attiva, perde affinità per GDP e la acquisisce per il GTP, che poi idrolizza. Le subunità beta e gamma attivano la PLC beta due, con conseguente apertura dei canali del calcio del RE e una conseguente prima depolarizzazione che determina l'apertura di TRPM5, da cui entra il sodio, determinando l'apertura di altri canali al sodio voltaggio-dipendenti, con la conseguente apertura dei canali pannexina. La subunità alfa non media la principale via di signalling, ma attiva comunque una fosfodiesterasi che idrolizza il cAMP, riducendo l'attività di PKA, che normalmente fosforila la PLC beta due, inibendola in parte (quindi in questo caso la PLC beta 2 è più attiva). Inoltre si pensa che PKA possa fosforilare i canali calcio sensibili all'IP3, riducendone l'apertura, quindi questo sarebbe un ulteriore motivo per voler ridurre l'attività di PKA (cit. Veronica Colpo).

Le popolazioni cellulari che si marcano con anticorpi per i singoli recettori sono separate, a supporto dell'ipotesi per cui questi recettori sono espressi in cellule diverse (cellule dell'amaro, del dolce…). Questo è ulteriormente avvalorato da esperimenti di delezione. Si fanno topi KO per TRPM5 e si vede che non percepiscono né dolce né amaro né umami. I topi wt, all'aumentare della concentrazione dello zucchero/glutammato di sodio, preferiscono sempre più il biberon gustoso, mentre i KO sono sempre 50-50. L'opposto vale per il chinino (amaro): all'aumentare della quantità di chinino i topi preferiscono sempre di più l'acqua liscia. Lo stesso vale per KO della PLC beta 2. Quando si reintegra il gene solo nelle cellule esprimenti un tipo di recettore i risultati comportamentali confermano i precedenti risultati di immunoistochimica: le cellule sono unimodali, non multimodali, perché c'è il recupero di una sola risposta alla volta. Quindi si deduce che le cellule di tipo 2, cioè le cellule recettoriali, sono cellule unimodali, che rispondono a un solo tipo di stimolo.

5/10

Percepiamo solo un tipo di dolce e salato, ma molte sfumature di amaro, il che dev'essere stato correlato con il successo evolutivo in un certo ambiente preistorico. La capsaicina ha un recettore TRPMV.
CD36: traslocasi degli acidi grassi a lunga catena (favorisce il passaggio attraverso la membrana). È presente sulle ciglia delle cellule gustative di tipo 2 (si credeva o 2 o 3). Per la percezione degli acidi grassi ci sono però altri candidati: GPR120 e GPR40, recettori accoppiati alla gusducina. Il CD36 interagisce direttamente con gli acidi grassi, e non è chiaro se c'è interazione con GPR120. A valle c'è l'attivazione di PLC beta 2. Tutti questi candidati però potrebbero avere funzioni diverse: la stimolazione a basse concentrazioni sembra essere dovuta a CD36, mentre GPR120 vede sovrastimolazioni. Topi KO per CP36 perdono la preferenza per i grassi, mentre KO per GPR120 non hanno fenotipi così estremi. Si è inoltre visto che durante i pasti c'è una downregolazione di CP36 che manca invece in topi obesi (meccanismo adattativo: mangi un cibo grasso ma almeno mangiane

poco, specie di porcellone!). L'espressione di GPR120 invece rimane costante durante il pasto, quindi sembra che questi due recettori non svolgano la stessa funzione: esistono nel nostro organismo sistemi anche ridondanti legati a funzioni fondamentali.

Il calcio potrebbe anche aprire canali rettificanti del potassio, che rispondono anche agli acidi grassi. Gli stessi TRPM5 sembrano aprirsi meglio in presenza di acidi grassi nel citoplasma.

Con ogni probabilità sarà la prossima modalità gustativa a venire canonizzata, ma mancano ancora dei tasselli.

La percezione dell'amaro è molto importante, in quanto molte tossine delle piante sono amare, e questa modalità gustativa ci protegge dall'avvelenamento. Rifiutare del tutto le sostanze amare però è sbagliato: numerosi principi attivi di farmaci sono sostanze amare. Nelle bevande invece gradiamo la presenza di un sapore amaro (tè, caffè, birra…): insomma scegliamo di ingerire alcune sostanze e di rifiutarne altre. Ci sono 25 geni nell'uomo per recettori dell'amaro, a cui si aggiunge una serie di pseudogeni. Se andiamo a vedere cosa questi recettori legano, vediamo che alcuni legano sostanze ben definite, mentre altri legano la stessa molecola: la caffeina lega quattro recettori diversi, mentre la PTC solo uno (il recettore 38). Ci sono recettori che legano molecole appartenenti a classi diverse, e altri che non hanno un ligando che sia stato pubblicato. L'industria alimentare è molto interessata alle percezioni gustative infatti. Ci sono pochi centri che si occupano di questo, e hanno molti fondi. Sarebbe importante che le persone assumessero sostanze amare: se uno è troppo disgustato dalle brassicacee (molecole amare) gli si potrebbe dare una pillola circondata da gastroprotettori con altre concentrazioni di sostanze amare che quando si legano ai loro recettori in altri posti del corpo hanno funzioni importanti.

Cromosoma 5, 7 e quasi tutti sul 12.

Non solo i recettori sono tanti, ma per ogni recettore ci sono degli SNP (snip: polimorfismi a singolo nucleotide) che complicano ulteriormente la faccenda. Gli SNP possono essere sinonimi, nel qual caso non è comunque detto che non ci siano conseguenze sul piano regolatorio, con sostituzioni in posti non importanti per la proteina, o con sostituzioni in sequenze importanti, con risultanti mutazioni loss o gain of function (percepiamo meglio una sostanza). Una sequenza importante in cui gli SNP hanno un effetto forte di loss of function è la sequenza di glicosilazione N-X-S/T, necessaria per la traslocazione in membrana.
Un'ulteriore complicazione è data dal fatto che possono dimerizzare, pure con recettori non per il gusto!

Un esempio di differenze nella funzione dovute a SNP è quello del recettore 38, che è sensibile alla PTC. Facciamo assaggiare striscette con diluizioni successive di glucosinolati che poggiamo sulla lingua degli assaggiatori, che alzano la mano quando sentono il sapore amaro. I super taster lo percepiscono meglio, i taster bene e i non taster male. Se facciamo lo stesso esperimento con un'altra sostanza amara anche i non taster la sentono: non c'è una conseguenza generalizzata. Il recettore 38 è anche quello con cui si sentono alcune sostanze degli alcolici. Gli AVI AVI non percepiscono l'amaro degli alcolici, ma solo la nota dolce. Questo sulla carta sembra funzionare, ma non ci sono differenze tra supertaster e taster (???).
Esperimenti di Barale sugli studenti di genetica che fumano o no.
Lavoro su vini rossi: i taster e super taster sentono l'amaro, i non taster no.
La preferenza per i vini rossi è maggiore negli uomini, ma se si stratificano maschi e femmine sulla base del loro genotipo si vede che la differenza si annulla quando consideriamo i non taster. Non c'è nessuna differenza per i bianchi, nemmeno quando stratifichiamo rispetto al genotipo.

Recettore 16: gain of function -> la variante permette di sentire a bassissime concentrazione i glucopiranosidi. Questa variante corrisponde alla sostituzione della lisina 172 con un'asparagina, e si è originata molto tempo fa in Africa, in zone in cui è endemica la malaria. Il fatto che la variante sia meglio stimolata si vede guardando il segnale di calcio in cellule esprimenti l'una e l'altra in risposta a sostanze stimolanti e vedendo che il segnale è maggiore in cellule esprimenti la variante con l'asparagina. La variante con la lisina ha un'EC50 maggiore. Quando si va a vedere la diffusione nel mondo di questa variante rispetto a quella iniziale, si vede che la frequenza della variante è maggiore dove la malaria è endemica, dove c'è il vantaggio dell'eterozigote.

Le HEK esprimono tutto tranne la gusducina e i recettori per l'amaro. Le vogliamo usare per caratterizzare i recettori in termine di risposta (livelli di calcio).
Stabilmente trasfettate con una chimera della proteina G. Proteina G espressa da queste cellule ingegnerizzandola sostituendo alcuni aa al C terminale con quelli della gusducina perché possa interagire con i recettori del gusto.
Plasmidi ingegnerizzati con i geni per i recettori per il gusto umani (geni facili: un migliaio di paia di basi e senza introni, la parte più difficile è stata isolarli). Si fa esprimere il recettore e gli si dà lo stimolo. Quindi si fanno esprimere recettori diversi e si vede

a che sostanze rispondono le cellule (misura di fluorescenza di colorante legante il calcio). Il ligando va saggiato almeno tre volte e a diverse concentrazioni, con controlli positivi e negativi. Quindi fare una lettura di un campione di cellule per volta non conviene. Se usiamo un sistema a 96 pozzetti con 96 puntali che sganciano in contemporanea i ligandi va meglio. Spendendo circa 30 mila euro possiamo comprare una fibra ottica che fa il giro di tutti i pozzetti, ma questo è un sistema poco efficiente perché i tempi del calcio sono molto brevi, quindi la lettura può essere fatta facilmente al momento sbagliato. La cosa migliore è allora avere una telecamera per ogni pozzetto, spendendo naturalmente di più, circa 7-800 mila euro, ma facendo una lettura istante per istante. Secondo controllo dell'impennata di fluorescenza con la somatostatina o l'isoprotenolo, che attiva i recettori beta adrenergici. Un controllo della specificità del recettore si fa usando il propil-tio-uracile, che stimola il recettore 38 come la PTC: non si ottiene risposta.
Una cosa che hanno fatto all'inizio è stato determinare quanti aa si dovessero modificare al C terminale della proteina G per avere una risposta allo stimolo: hanno funzionato solo le chimere con 37 e 44 aa modificati. Si è poi usata quella con 44 aa modificati. Sempre nell'ambito di questo studio si è verificato che altre proteine G oltre alla gusducina possono funzionare in associazione a un recettore gustativo. Si sono usati gli ultimi 44 aa di altre proteine G presenti nelle cellule gustative: la proteina Z non funziona, ma T1 e T2 funzionano e quindi possono essere usate nella trasduzione del segnale. Il brevetto di questo costrutto è poi stato ceduto a un'azienda alimentare degli stati uniti, a cui si deve chiedere il permesso di usare queste cellule con la chimera.
L'epitopo di HSV al 3' si usa perché altrimenti dovremmo avere tanti anticorpi quanti sono i recettori (25): così posso usare sempre lo stesso anticorpo per andare a verificare la trasfezione delle cellule. All'inizio vediamo rosso e verde ma poco arancione: il recettore non è in membrana. Si mette quindi al 5' un epitopo che guida l'espressione in membrana. Si vede che comunque l'efficienza di trasfezione è bassa, anche perché per guidare un recettore in membrana servono chaperonine come le RTP (receptor transporting proteins) 3 e 4.

Dimerizzazione
Glicosilazione nel RE. La glicosilazione comincia sul lato citoplasmatico del RE e si sposta con un flip flop sul lato interno. La tunicamicina blocca la glicosilazione nelle prime fasi, quando il gruppo fosfato riceve il gruppo glicosidico che andrebbe aggiunto alla proteina in crescita. Se facciamo un Western Blot vediamo un peso di circa 25000 Da, mentre con la tunicamicina il peso è minore. L'importanza della sequenza consenso si vede anche con una mutazione sito-specifica. Vediamo in entrambi i casi che i picchi delle curve dose-risposta alla salicina si abbassano, scomparendo in realtà del tutto nel secondo caso. Nel primo caso notiamo anche che il secondo picco, quello dovuto alla seconda stimolazione, invece non è intaccato dalla tunicamicina.

12/10

Virtualmente possiamo percepire tutte le molecole presenti nell'aria, oltre 100 mila. Recettori a bassa soglia. C'è una grande differenza nella soglia di percezione di sostanze diverse: il muschio soglia molto bassa, il wintergreen (la menta del Nepal) ha una soglia alta. Almeno sei unità logaritmiche di differenza nella capacità di percezione, le femmine hanno una capacità di percepire l'odore superiore. Mentre i recettori gustativi sono portati da cellule epiteliali specializzate, non neuroni, quelle olfattive sono neuroni, gli unici neuroni che mantengono in tutta la vita un'elevata capacità rigenerativa. Gli uomini hanno circa 350 recettori olfattivi funzionanti, circa l'1% del DNA umano, una delle famiglie geniche con più membri espressi. Tranne il cromosoma 8, il 20 e l'Y tutti i cromosomi presentano cluster di geni olfattivi, la maggior parte sul cromosoma 11.
Riusciamo a percepire come odori diversi molecole molto simili: c'è un solo metile di differenza tra pera e banana. È importante il gruppo funzionale: alcoli fruttati, acidi rancido.
La femmina in estro produce feromoni che inducono il maschio all'accoppiamento. Le prede sentono feromoni liberati dai predatori che stimolano la fuga: comportamenti sessuali (ma anche regolazione del ciclo mestruale; il topo secerne molecole che stimolano l'estro della topa, gli scarichi vaginali della topa stimolano il comportamento sessuale del maschio), aggressivi, materni sono mediati dalla percezione di feromoni. Feromoni per riconoscere membri dello stesso gruppo e tra questi membri con cui si hanno rapporti preferenziali: gattino a occhi chiusi che trova il seno della madre. Segnali di dominanza sociale del maschio alfa (puzzola, ma anche scimmie: normalmente gridano, ma possono produrre feromoni che gli altri percepiscono, due che si gridano contro e uno secerne molecola perché ha paura -> l'altro sa che sta per vincere). Sono segnali rilasciati nelle feci e nelle urine: ci sono ghiandole nelle pareti vaginali che inducono l'accoppiamento. La mangusta ha ghiandole anali per secernere sei diversi acidi carbossilici per il riconoscimento. L'opossum dominante riconosce gli opossum del suo stesso gruppo, discriminandoli dagli altri, perché li marchia. Gli elefanti hanno secrezioni del lobo temporale che inducono aggressività o comportamenti sessuali. Nel naso gli animali hanno un organo tubulare cavo con recettori di una famiglia diversa rispetto a quelli olfattivi, che stimolano i nervi vomero nasali che proiettano a una struttura accessoria rispetto al bulbo olfattivo (bulbo olfattivo accessorio). Effetti dei feromoni nei mammiferi: feromoni rilasciati dal maschio stimolano l'ingresso delle femmine in pubertà. Se le tope sono in gabbia in gruppo, una femmina in estro secerne segnali chimici che reprimono l'estro delle altre

femmine. Se una topa appena accoppiatasi sente l'odore di un altro maschio anche appena dopo la fertilizzazione non rimane gravida. Nell'hamster la femmina produce nello scarico vaginale un feromone percepito tramite il legame con l'afrodisina, proteina della mucosa olfattiva del maschio. Se la scrofa in estro è stimolata con l'odore del maschio comincia a ruotare e ha un comportamento particolare. L'organo vomero nasale non c'è nell'uomo, solo vestigia. Se si fanno però test psico-fisici il dubbio rimane e ha spinto alla produzione di profumi a base di feromoni per attirare. Se ci sono più donne che lavorano nella stessa stanza i cicli si sincronizzano generalmente a quello della femmina leader. Se stimolati con odore vaginale, sia uomini che donne trovano delle foto di ragazze più sexy. Le donne preferiscono sedersi su una sedia spruzzata con androstanone (presente nell'urina del maschio). Ciascuno trova la propria pipì di un odore sgradevole, ma ad esempio il 9% degli uomini è anosmico all'androstanone. È un odore che si sente nelle porcilaie: la gradevolezza di un odore dipende dal tipo di individuo (???? 31:50).
Il progetto genoma ha svelato, cosa molto inaspettata, che ci sono circa mille geni che codificano per recettori olfattivi. Negli animali ci sono altre due famiglie geniche espresse nell'organo vomero-nasale, che sono candidati come geni dei recettori dei feromoni. Queste due famiglie sono V1 (circa 35 geni) e V2 (circa 150 geni con un N terminale extracellulare lunghissimo). I recettori della famiglia V2 percepiscono le sostanze utilizzando quindi il dominio N terminale. Mentre la percezione dell'odore è transpecifica, perché tutti sentiamo gli stessi odori, la percezione dei feromoni è importante per la singola specie, e questo è probabilmente alla base della distinzione tra le due classi di sostanze. I recettori con un lungo N terminale è possibilmente legato al fatto che un sistema di riconoscimento ingessato (V1) rende difficile percepire nuovi predatori, mentre magari i recettori della famiglia V2 si prestano meglio alla percezione di feromoni nuovi. La farfalla usa ampi sensilla per percepire sia odori che feromoni. L'uomo usa l'olfatto per sentire cose che gli piacciono o gli servono: il muschio indica la presenza d'acqua, il gas si addiziona con solfuri per rendere evidenti le perdite. Le sostanze olfattive sono normalmente idrofobiche, il che è un ostacolo perché i recettori sono nella mucosa olfattiva, immersa nel muco che è praticamente acqua.
Ci sono casi in cui l'odore di una cosa è dovuto a una sola molecola: il porcino è l'1-otten-3-olo, il peperone è la 2 isobutil 3 metossi pirazina (entrambi a bassa soglia). La sua tesi di laurea si basava su recettori olfattivi con una scuola perdente, pre-Axel e Buck. Alla fine degli anni 80 c'erano rudimentali tecniche di PCR e non tutti le potevano usare, e si usavano substrati radioattivi. La 2 isobutil 3 metossi pirazina radioattiva si provava con recettori putativi immobilizzati su membrane e poi lavati. A quel punto si verificava la presenza di radioattività sul filtro. Si usano concentrazioni scalari di 2 isobutil metossi pirazina fredda, e si vede che la radioattività si riduce, perché restano attaccate le molecole non radioattive. Lui puzzava di peperone. Il suo prof studiava i recettori dei feromoni delle farfalle e in primavera andarono a pranzo alle piagge e lui fu circondato da tutte le farfalle.
L'eugenolo è l'odore dei chiodi di garofano e il citronellale quello del limone, anch'essi rappresentati da singole molecole. Nella fase aerea del vino ci sono moltissime componenti (vino in una provetta forata con siringa che aspira il vapore, saturato di molecole odorose). Questa varietà non è prerogativa dei vini pregiati: magari nel tavernello le concentrazioni sono minori, ma la quantità è comunque abbondantissima.
Il 2-4 nonadienale è l'odore delle cimici schiacciate e del pistacchio: il contesto è importante, e la cimice ne rilascia molto più del pistacchio. Etil acetato sia nella frutta che nella vernice. L'acido isovalerico è l'odore del gorgonzola e anche del sudore. In tutti questi casi la concentrazione è maggiore. Il dimetil solfuro è l'odore dei tartufi ma, ad alta concentrazione, quello del metano. La geosmina è l'odore dell'erba (bassa soglia: acqua).
Magari non capiamo quanti odori ci sono, ma poi se pensiamo al nostro lessico ce ne rendiamo conto.

L'olfatto dei pesci è diverso da quello dei terrestri, che sentono molecole aeriformi lipofile. I pesci sentono molecole disciolte in acqua idrofile, e i pesci percepiscono tipicamente acidi biliari e aminoacidi, molto facilmente idrosolubili appunto. Il bluegill sunfish è un molide delle acque dolci della east coast. È sottoposto a molta pressione nella stagione degli accoppiamenti: la madre depone le uova e sia alla fecondazione che all'accudimento fino e poco dopo oltre la schiusa pensa il maschio. Ci sono due polimorfismi del maschio, parentale e cornificatore. Il parentale raggiunge la maturità sessuale a sette anni e dopo la fecondazione delle uova sta i 2-3 giorni che ci vogliono fino alla schiusa e altri 5-7 giorni finché i piccoli non sono autosufficienti (prima sono molto soggetti ai predatori). In questa decina di giorni non si nutre, quindi perde circa il 10% del suo peso, con un importante prezzo energetico di questo comportamento che viene ripagato in termini di successo riproduttivo. Il cornificatore è già maturo a 2-3 anni, ma allora ha una livrea diversa, da sneaker, mentre verso i 4 anni diventa un satellite, simile a una femmina matura (4-8 anni). Quindi il maschio parentale sta in allerta rispetto allo sneaker e usa l'olfatto per capire alla schiusa delle uova i piccoli sono suoi. Se vede lo sneaker riduce le cure parentali e poi alla schiusa, se sono suoi, le riprende. Se invece arriva un satellite, il parentale cura le uova e alla schiusa capisce che i figli non sono suoi e li abbandona. Si sono fatti esperimenti che infatti indicano che non ci sia solo un approccio visivo al riconoscimento del self dal non self. Esperimento 1: maschio parentale con quattro acquari attorno con sneaker (che riconosce): il maschio vede gli sneaker e non se la sente di sprecare energia per le uova. Al momento della schiusa qualcosa che non è un segnale visivo lo spinge ad aumentare le cure. Esperimento 2: 1/3 uova prelevate, lavate (controllo) o sostituite con uova fecondate da uno sneaker (trattamento). Quindi insomma l'odore lo sentono solo alla schiusa!

Nella cavità nasale ci sono l'epitelio respiratorio e l'epitelio olfattivo, con neuroni bipolari che con i dendriti percepiscono le sostanze presenti nello strato di muco e il cui assone attraversa la base cribrosa del cranio (etmoide) per entrare nel bulbo olfattivo, dove le cellule mitrali mandano i propri assoni nel tratto olfattivo alla corteccia olfattiva. L'olfatto è quindi l'unico senso per cui non si ha un passaggio delle informazioni dal talamo. È anche vero che il talamo sarebbe da un'altra parte, mentre il bulbo è proprio sotto il punto in cui le informazioni devono arrivare: il talamo riceve comunque l'informazione olfattiva, ma la riceve dopo, dalla corteccia. I recettori sono sulle ciglia olfattive. Ci sono poi le cellule di supporto (sia strutturale che metabolico, con microvilli: piccoli, mentre i neuroni olfattivi sono dotati di lunghe ciglia su cui si affacciano i recettori) e le cellule basali, staminali adulte, non tutte uguali. La degenerazione dei neuroni olfattivi avviene di continuo, sono molto esposti. Nella porzione basale dell'epitelio ci sono ghiandole di bowmann, che con il dotto escretore attraversano lo spessore dell'epitelio e rilasciano al livello apicale il muco. Nel bulbo la sinapsi tra neurone primario e cellule mitrali avviene in strutture anatomicamente precise, i glomeruli.

19/10

Molti recettori: il numero è secondo solo a quello del sistema visivo, e grande superficie data dalle ciglia (22 cm2 vs 7 m2 del cane). I neuroni hanno vita di circa due mesi, ma nonostante la capacità olfattiva decresca durante la vita c'è un continuo rimpiazzo che permette di continuare a sentire gli odori. Una delle capacità di rigenerazione è dovuta al fatto che da un lato ci sono cellule staminali e dall'altro ci sono particolari cellule gliali, le OEC (olfactory ensheathing cells), che avvolgono l'assone dei neuroni olfattivi, accompagnandoli verso il bulbo. Queste cellule da un lato creano un cono avvolgente in cui sono secrete molecole che stimolano la staminalità e il differenziamento delle cellule staminali: la cellula appena differenziata trova una sorta di binario entro cui far crescere il proprio assone. Ci sono cellule staminali globose, che possono differenziarsi sia in neuroni che in cellule OEC o di supporto, le cellule staminali orizzontali, che mantengono la popolazione delle cellule globose. La guaina delle OEC finisce al livello del SNC (perché il bulbo è già SNC). Cellule di questo tipo sono o di Schwann (SNP) o oligodendrociti (SNC): le cellule di Schwann avvolgono un solo assone e possono recuperare la degenerazione di un assone, soprattutto nella parte distale, secernendo fattori e generando una sorta di cono di crescita. Gli oligodendrociti invece possono coprire più assoni ciascuno e inibiscono la rigenerazione dell'assone. Le OEC sono a metà tra i due tipi: dal punto di vista funzionale e anche molecolare sono una popolazione eterogenea, alcune hanno una morfologia sferica e non formano la guaina, mentre ce ne sono altre con una forma allungata o ramificata che inguainano gli assoni. Secernono moltissimi fattori tropici e inducono pathway di differenziamento neuronale; possono esse stesse differenziarsi in neuroni. Dei giapponesi hanno sdifferenziato e redifferenziato in neuroni dei fibroblasti, ma è una tecnica poco efficiente e non utilizzabile: non possiamo reimpiantare delle cellule che possono essere non solo neuroni e poi mettere un sacco di fibroblasti. Da questo punto di vista invece queste cellule sono interessanti, perché sono macrogliali (quindi neurali) e possono differenziarsi in neuroni. Visto che formano un cono di crescita, stimolano il trofismo neuronale e inguainano il neurone, queste cellule - che in questo sono più efficienti delle cellule di Schwann - possono essere usate per questo motivo per impianti in lesioni e per frenare la degenerazione del SNC, cosa che non può essere fatta impiantando cellule di Schwann perché incompatibili con gli oligodendrociti, con cui anzi danno un effetto barriera.

Ci sono tra 5 e 10 milioni di neuroni olfattivi. Circa il 5% del genoma codifica recettori olfattivi (investimento enorme), nell'uomo le cose sono diverse, ma comunque c'è un 1%. Axel e Buck verificano che c'è una regola 1:1:1 : un neurone olfattivo esprime un solo recettore olfattivo e proietta a un glomerulo. Il numero di glomeruli è nettamente inferiore rispetto ai recettori, e c'è una convergenza (per questo siamo sensibili a bassissime soglie): gli assoni di tutti i neuroni olfattivi che esprimono un dato recettore vanno nello stesso glomerulo, a prescindere da dove i neuroni olfattivi siano collocati nell'epitelio (Axel e Buck hanno dimostrato anche che ci sono quattro zone dell'epitelio olfattivo in cui queste popolazioni di neuroni sono scatterate, con i neuroni con lo stesso recettore dispersi). In realtà non vanno tutti a un singolo glomerulo, ma a 4-5 glomeruli, però è vero che un singolo glomerulo riceve afferenze da neuroni esprimenti tutti lo stesso recettore. Nei glomeruli ci sono i dendriti delle cellule mitrali.
La capacità di distinguere odori di molecole anche leggermente diverse (esanolo ed ettanolo ad esempio) è dovuta al fatto che al livello del bulbo ci sono anche le cellule dei granuli, che fanno un'azione "filtro". Il glomerulo non è solo una stazione di passaggio, perché dal bulbo parte un'informazione già elaborata. Le cellule mitrali realizzano dei cut-off che puliscono il segnale, eliminando il rumore di fondo e acuendo invece lo stimolo preferenziale. La cellula mitrale che riceve afferenze da neuroni olfattivi che rispondono preferenzialmente ad aldeidi C7 ma anche ad aldeidi C5, risponde localmente ad aldeidi C5, ma non spara un potenziale d'azione. Questo è un fenomeno che possiamo ricondurre all'inibizione laterale vista nel caso della sensibilità somatica dei polpastrelli a uno spillo: la capacità di avvertire precisamente la puntura è dovuta sia alla grande densità di recettori sia al fatto che il neurone stimolato manda delle collaterali a inibire i neuroni circostanti, aumentando il contrasto dello stimolo. Oltre alle cellule mitrali anche le cellule a pennacchio fanno sinapsi con i neuroni olfattivi, ma comunque il tratto olfattivo è prevalentemente fatto dagli assoni delle mitrali. Il tratto olfattivo proietta alla corteccia piriforme,

principale corteccia olfattiva da cui si dipartono neuroni che vanno alla corteccia entorinale, all'amigdala e insomma ad aree connesse ai ricordi e alle associazioni. Collaterali del tratto olfattivo prendono contatto con neuroni del nucelo olfattorio anteriore, che proiettano poi all'altro bulbo olfattivo, con una continua informazione delle due metà su ciò che l'altra metà sta sentendo. Le informazioni arrivano anche al talamo e ai neuroni bimodali della corteccia orbito-frontale che creano associazioni forti tra stimoli di nature diverse. Se vediamo l'estensione dell'epitelio e il numero di recettori, vediamo che l'estensione è condizionata all'importanza dell'olfatto per l'animale, ma soprattutto la densità recettoriale è dipendente dall'importanza della percezione olfattiva. Chiara differenza tra l'estensione del bulbo di topo e uomo. Due odori distinti attivano popolazioni neuronali distinte nella corteccia.
Ci sono soggetti anosmici, geneticamente non in grado di percepire alcuni odori. Il 10% di noi è anosmico per l'urina. Circa il 90% dei soggetti è in grado di riconoscere tutti gli odori di 7 proposti, mentre almeno la metà degli anosmici non è in grado di distinguerne nemmeno uno. Se andiamo a vedere con tecniche di imaging funzionale il numero (la quantità approx) che si attivano in un soggetto giovane e in uno anziano, vediamo che sono molti di più nel giovane e che sono anche più nelle donne. Un segno precoce di parkinson e alzheimer è l'anosmia. C'è una differenza di genere tra le zone attivate da odori diversi, mentre nello stesso sesso si attivano le stesse zone. Siamo in grado anche di distinguere due enantiomeri della stessa sostanza: nel caso del limonene le stesse zone sono stimolate dai due enantiomeri, mentre percepiamo i due enantiomeri del carvone in maniera diversa, con aree diverse che si attivano. Il fatto che i recettori siano nelle ciglia si può dimostrare con un elettro olfatto gramma: prendiamo dei neuroni olfattivi messi in coltura e inseriamo un elettrodo di registrazione nel soma. Se lo stimolo olfattivo è applicato sul soma non c'è depolarizzazione, mentre se è applicato sulle ciglia c'è un potenziale d'azione. Se facciamo lo stesso dopo aver rimosso le ciglia (si distruggono con un tampone a salinità elevata) non c'è nessuna depolarizzazione: le ciglia sono necessarie per la percezione. I recettori olfattivi sono espressi da tutti gli animali, C. elegans ha quasi 1000 geni, la drosophila circa 100, entrambi con introni (meno in drosophila e completamente assenti nell'uomo). L'uomo ha circa 950 geni, di cui 600 però pseudogeni. La presenza dei recettori olfattivi si dimostra facilmente. Intanto possiamo distinguere l'epitelio olfattivo e quello respiratorio: l'osso è convoluto nella zona olfattiva e liscio in quella respiratoria, ma possiamo soprattutto marcare le cellule olfattive perché presentano la OMP, assente in altre cellule. Se dopo questa marcatura poi facciamo delle marcature per recettori diversi vediamo che recettori distinti stanno sulle ciglia. Il signalling accoppiato alla percezione olfattiva deve indurre una corrente elettrotonica che deve arrivare al monticolo assonale (sopraliminare????). I recettori sono GPCR con sette eliche transmembrana, la subunità alfa della proteina G è la subunità alfa olf, anche se poi si è visto che non è unica dei recettori olfattivi. Una volta che lo stimolo lega il recettore, la subunità alfa con il GTP legato interagisce con l'isoforma 3 dell'adenilato ciclasi. I neuroni olfattivi hanno canali cationici sensibili ai nucleotidi ciclici: il cAMP vi si lega facendoli aprire, con l'ingresso di sodio e calcio, che serve anche ad attivare l'apertura di canali al cloro calcio-dipendenti che mediano un'uscita del cloro che stabilizzano la depolarizzazione, rendendo possibile la trasmissione elettrotonica della corrente fino al monticolo assonale. L'inattivazione del segnale è data dall'attività GTPasica della subunità alfa, ci sono poi fosfodiesterasi calcio sensibili (il calcio quindi non attiva solo la depolarizzazione mediata dal cloro), poi ci sono proteine che sequestrano il calcio e altre che modificano l'adenilato ciclasi, inibendola. C'è inoltre un adattamento agli odori dei recettori olfattivi. Tutti i GPCR, recettori olfattivi inclusi, hanno dei residui di tirosina, serina e treonina che possono essere fosforilati da PKA: i residui fosforilati sono riconosciuti dalla beta arrestina, che fa legare altre molecole, con il reclutamento della clatrina e l'internalizzazione dei recettori. Ci sono anche chinasi specifiche per i recettori olfattivi, con una fosforilazione autologa (???? Contrapposto a quella generale, eterologa). La clatrina forma strati con fasce a cinque e con fasce a sei, la membrana è costretta a invaginarsi a causa di questa alternanza, si formano vescicole e poi la clatrina si ricicla e la vescicola può o essere endofagocitata o riemmessa in membrana. Registriamo l'elettro olfatto gramma di topi KO per la proteina G olf: il tracciato è piatto. Lo stesso è vero per KO per i canali cationici sensibili ai nucleotidi ciclici.
Sottoponendo neuroni olfattivi diversi a sostanze diverse possiamo vedere che alcuni hanno una maggiore selettività mentre altri una minore selettività che dipende dal recettore espresso. Vediamo anche che la concentrazione di una sostanza odorosa può essere percepita sia in termini di frequenza di scarica del neurone (che aumenta con la concentrazione) sia in termini di numero di neuroni reclutati nella percezione. Se facciamo un imaging funzionale dei glomeruli vediamo che sostanze anche molto simili che differiscono unicamente per il numero di atomi di carbonio nella catena attivano glomeruli diversi.

26/10

Axel e Buck partono da due possibilità: pochi recettori che si combinano (es: vista) o tanti recettori per tante sostanze. Si conoscevano circa 40 anosmie specifiche, e questo suggeriva che ci fosse una via di mezzo tra le due cose (almeno 40 recettori). Le anosmie possono essere anosmie di conduzione o anosmie di generazione (sensorineurali), causate da traumi o neurodegenerazione.
Per trovare i recettori si doveva trovare intanto l'epitelio olfattivo, che si sapeva essere caratterizzato da aumenti di cAMP in relazione a sostanze applicate: indipendentemente dalla sostanza la risposta era sempre accompagnata da cAMP (in certi casi

anche da IP3). Con approcci biochimici (inibitori) si mostrava che questo aumento era mediato da proteine G stimolatorie. I recettori erano allora probabilmente GPCR. Usando approcci di biologia molecolare inizialmente isolano 20 geni e poi altri geni; il progetto genoma (2001) mostra che ce ne sono circa mille. Ci sono alcuni residui costanti, residui variabili e residui ipervariabili. Identificano una serie di residui conservati dei GPCR noti comparandone le sequenze: questi residui sono probabilmente mantenuti anche in questi GPCR. Se effettivamente c'è una superfamiglia di GPCR olfattivi, facendo delle PCR per tanti GPCR potrebbero esserci tanti geni con la stessa identica lunghezza. Se il gene è solo uno, facendo una restrizione si dovrebbero ottenere solo frammenti più piccoli la cui somma delle lunghezze è quella giusta. Quindi hanno amplificato tutti i recettori, ma la restrizione ha messo in luce differenze di sequenza. I primer usati sono diretti contro regioni comuni dei GPCR, e si fa un'ish per andare a vedere cosa viene ibridato a regioni comuni. Sequenziano solo i recettori nuovi. Vedono che un neurone olfattivo esprime un solo recettore usando una single-cell PCR dopo aver frammentato l'epitelio olfattivo. In successione usano poi tanti odoranti e vi sottopongono i neuroni olfattivi. Poi prendono le cellule che rispondono a un certo odorante e fanno una PCR con i primer per tutti i recettori finora individuati (nel primo studio 13-18): si vede che solo un recettore è espresso in un neurone. Da questo lavoro deducono la prima regola: un neurone, un recettore. In realtà ci sono dei casi di passaggio durante lo sviluppo da un recettore all'altro quando un recettore comincia a essere indotto. Verificano inoltre il principio di esclusione allelica casuale. Ci sono quattro domini nella mucosa olfattiva: i neuroni esprimenti ciascun recettore sono dispersi in questi domini, non clusterizzati in modo particolare. Infine, dimostrano la convergenza dei neuroni che percepiscono lo stesso odore sullo stesso glomerulo. La presenza di recettori dispersi la mostrano con tecniche di fluorescenza. Sempre con tecniche di immunofluorescenza dimostrano la convergenza degli assoni. Usando ish possiamo vedere tutti i neuroni che si attivano a un determinato stimolo. La convergenza si dimostra usando ish per identificare il glomerulo a cui i neuroni sensibili a un certo stimolo proiettano. Marcando con la galattosidasi la proteina tau, che si lega ai microtubuli, e stimolando con il galattosio, si vedono gli assoni che vanno verso un unico glomerulo. In qualche modo il recettore olfattivo dirige il neurone verso un glomerulo. In un esperimento di cambiamento di recettore si vede che in alcuni casi la modifica del recettore comporta lo spostamento dell'assone su un altro glomerulo. L'espressione del recettore è quindi probabilmente necessaria ma non sufficiente per il direzionamento. Questa convergenza comporta una sommazione al bulbo: ci sono circa 10 milioni di neuroni olfattivi con circa 1000 recettori (nel ratto), quindi è necessaria una sommazione al livello delle cellule mitrali, stimolate in maniera molto efficiente: la capacità di percepire basse concentrazioni ha quindi una spiegazione anatomica.

Matrice: le righe sono il numero di C, le colonne il gruppo funzionale
Prendono neuroni olfattivi con recettori diversi e li espongono a sostanze diverse: tabella recettore x sostanza -> ogni sostanza stimola un pattern unico di recettori (ma stimola anche più di un recettore). Quindi l'odore è riconosciuto alla particolare combinazione di recettori olfattivi attivati (codice combinatorico). Lo stesso recettore può essere coinvolto, in contesti combinatorici sempre diversi, nella percezione di più molecole. Vediamo che l'ottanolo e il nonanolo attivano recettori attivati anche dall'acido ottanoico e dall'acido nonanoico rispettivamente: gli acidi però stimolano anche altri recettori. La concentrazione è anche percepita dalla stimolazione di sempre più recettori a soglie sempre più alte man mano che la concentrazione cresce.

Al livello del bulbo la combinatorietà è mantenuta: lo stesso codice è mantenuto sia in periferia che al livello del bulbo e dei glomeruli (se un odore attiva cinque recettori si attiveranno cinque glomeruli). Questa organizzazione dei glomeruli permette sia una maggiore sensibilizzazione agli odori, che appunto consente di sentire basse concentrazioni di sostanze, sia una clusterizzazione precisa delle cellule mitrali che si attivano in risposta a determinati odori, il che permette a sua volta che il codice neurale di un odore resti costante nel tempo nonostante la continua rigenerazione dei neuroni olfattivi. Questo è importante per poter legare ricordi agli odori.

In periferia e nel glomerulo lo stimolo è codificato dall'attivazione differenziale rispettivamente di neuroni e glomeruli diversi.
Al livello della corteccia un mantenimento di questo tipo di combinatorietà, con un'organizzazione del tipo un gomerulo -> un neurone corticale/una popolazione di neuroni corticali richiederebbe la presenza di troppi neuroni corticali rispetto a quelli presenti effettivamente. Quello che si è visto è che invece i neuroni corticali sono dei rilevatori di combinazioni. Prendiamo la vanillina, che determina l'odore di vaniglia. Supponiamo che stimoli i recettori 1-4, che a loro volta attivano certi glomeruli. Nella corteccia ci saranno neuroni che rispondono alle diverse combinazioni di recettori 1-4 (1, 1-2, 1-3,…): i neuroni che ricevono input solo dai neuroni che in periferia sono di un solo recettore non si attivano nella risposta. È come se ci fosse un cut-off nella stimolazione dei neuroni corticali: si attivano solo quelli raggiunti dalla combinazione delle stimolazioni (o da combinazioni comunque maggiori di uno???). Questo è un sistema che permette di eliminare il rumore di fondo. Tra l'altro nella corteccia ci sono anche altre aree, es: amigdala e ippocampo, legate agli odori.

L'arrivo dell'aria direttamente sulle ciglia sarebbe un trauma meccanico forte evitato da uno strato di muco che copre le ciglia. Il muco è composto prevalentemente da acqua -> problema. Nella componente solubile del muco è presente a concentrazioni

enormi (mM) una famiglia di proteine detta delle OBP (odorant binding), che non potevano non avere una funzione olfattiva (c'è un investimento energetico per produrle troppo elevato perché non sia così) e che sono in grado di legare odori e feromoni. Sono 81 negli insetti, 82 nei vertebrati, individuate in studi paralleli. Sia nel muco dei vertebrati che nei sensilla delle antenne degli insetti sono presenti queste proteine a concentrazioni molto elevate e sono in grado di legare gli odori. Si prova facendo un odore marcato radioattivamente e si vede che queste cose legano gli odori. Negli insetti sono divise in due famiglie (una dei feromoni OBP e CSP), ma sono tutte simili: basso peso molecolare, ponti disolfuro importanti per la funzione e sono della famiglia delle lipocaline (= motivi a 8 foglietti antiparalleli e un piccolo segmento ad alfa elica che circoscrivono una struttura a beta barile, tasca idrofobica in cui possono essere alloggiate le molecole odoranti). Da questa struttura deriva l'idea che siano dei traghettatori. Sono state identificate per la isobutil metossipirazina del peperone e per un feromone della farfalla, ma sono abbastanza aspecifiche. Tutti i vertebrati le esprimono, e ci sono diverse isoforme di OBP. Non ce ne sono comunque mai più di 10 (inteso come in nessuna specie). Si pensa che quindi svolgano un ruolo nella percezione olfattiva, anche perché le lipocaline sono usate nella percezione di segnali chimici. L'afrodisina dell'hamster, che lega un alcol, stimola nel maschio il comportamento sessuale (la femmina produce sia proteina che ligando): potrebbe essere un esempio. Le lipocaline sono anche salivari, e questo rimanda al coinvolgimento di gusto e olfatto negli animali. Il maschio del maiale ha elevate quantità di due proteine appartenenti alle lipocaline che mancano nella femmina, che invece secerne i ligandi di queste proteine. Nella linfa dei sensilla ci sono le stesse proteine, e sono state usate per la lotta alle invasioni da insetti legandole a dei feromoni per allontanare gli insetti dalle colture. Dato che legano un po' tutti gli odori, inizialmente si sono ipotizzati ruoli aspecifici. Potrebbero essere dei generali solubilizzatori di ligandi idrofobici, il cui attraversamento della linfa o del muco è così favorito a concentrazioni maggiori. Questo è un po' quello che succede agli ormoni steroidei, che viaggiano nel plasma con proteine di trasporto. Il fatto che però esistano in varie isoforme e che abbiano pattern di ligandi solo parzialmente sovrapposti fa pensare a un ruolo specifico delle OBP verso particolari ligandi, che quindi sono i ligandi di cui si aumenta preferenzialmente la concentrazione. Le OBP possono anche mediare la discriminazione tra stereoisomeri diversi di un tipo di ligando, o ancora può essere il complesso OBP-ligando a determinare la risposta del recettore. Con tecniche di spettroscopia e cristallografia si vede che quando il ligando occupa il beta barile all'interno dell'OBP c'è un cambiamento conformazionale. Una possibilità dimostrata negli insetti è che le OBP formino una sorta di canale che, attraverso il passaggio del ligando, porta il ligando sul recettore (EEEEEEHHHH?). Si è fatto un esperimento elegante in drosophila: due acidi, esaronico e ottaronico, secreti dalla stessa pianta, Morinda citrifolia, risultano essere attraenti per la d sechellia e repellenti per la d simulans. Dei giapponesi hanno preso una d melanogaster mutante nulla per le OBP, cioè che non esprime OBP. Questo mutante è ingegnerizzato per le OBP prodotte da d sechellia. Le drosophile si usano molto non solo perché facili da manipolare, ma anche perché si possono fare delle minime analisi comportamentali. La d melanogaster esprimente l'OBP di sechellia è attratta dalla pianta: la OBP l'ha resa sensibile ai due acidi. Quindi il ruolo della OBP è incerto ma evidente. Nel caso di questi insetti il cambiamento conformazionale dell'OBP determina la rotazione di una parte della struttura, che da che è rivolta verso l'esterno si rivolge verso l'interno. Gli autori hanno visto che il feromone da solo non è in grado di stimolare la risposta nell'insetto, e nemmeno l'OBP da sola. Se si fa mutagenesi sito specifica dell'OBP per ottenere un ripiegamento del braccio nella conformazione legata, si vede che il recettore viene stimolato dalla sola OBP anche in assenza di feromone. Quindi il legame OBP-feromone è necessario per il riconoscimento del feromone. La reale funzione è quindi incognita, ma c'è un ruolo nella percezione olfattiva.

2/11

Gusto e olfatto: capacità molto versatile di percepire sostanze chimiche che può essere riciclata in altri contesti.
Guardiamo i recettori per il dolce: l'alfa gusducina, la subunità beta 3 e gamma 13 sono espresse anche negli enterociti L, insieme a TRPM5 e PLC beta 2 e T1R3. Gli enterociti L sono cellule deputate alla secrezione del glucagon-like peptide 1 (GLP1). Queste componenti sono espresse anche nelle cellule K, che producono GIP (peptide insulino tropico glucosio dipenente, o peptide gastrico). GLP e GIP sono incretine e hanno un ruolo importante nel metabolismo glucidico. GLP 1 è anche uno degli stimoli precoci per la sintesi anticipatoria dell'insulina: lo stimolo principale è il glucosio, ma questo ormone lo precede e viene secreto in seguito a masticazione e passaggio del bolo. Nel pancreas GLP stimola la produzione di insulina, inibendo l'apoptosi e stimolando la proliferazione delle cellule beta, e inibisce la produzione di glucagone. Aumenta inoltre la sensibilità all'insulina, per esempio a livello epatico, dove inibisce la liberazione del glucosio dal glicogeno e stimola il suo immagazzinamento e la sua entrata negli epatociti. Le incretine hanno anche effetti generalizzati in quanto cardio e neuroprotettive. Oggi vanno molto gli studi sull'asse microbioma del digerente - cervello: il mangiar bene può indurre la produzione di ormoni con effetto neuroprotettivo, mentre al contario un altro problema del cibo spazzatura è che causa problemi al livello cerebrale. Questa via di segnalazione è espressa nelle cellule secernenti le incretine, e di conseguenza si è ipotizzato che la risposta alle sostanze dolci inducesse la secrezione di incretine.

Se andiamo a vedere i recettori per il dolce, sono espressi nell'intestino. In un lavoro recente si vede che l'alfa gusducina, la subunità beta tre e la subunità gamma tredici della proteina G specifica per la proteina G gustativa, i TRPM5 e la PLC beta 2

(quindi membri della via attivata da un sapore dolce), la subunità T1r3 sono coespresse dagli enterocoliti di tipo L , cellule deputate alla produzione del GLP1 (glucagon like peptide 1). Si vede dai merge che le cellule positive ai membri della cascata del segnale attivata da un sapore dolce sono proprio le cellule che producono GLP1. Se guardiamo altri pannelli, lo stesso vale per le cellule K, che sono quelle che producono il GIP, peptide insulinotropico glucosio-dipendente (o peptide gastrico). Entrambi appartengono alla categoria di ormoni detti incretine, con un ruolo importante nel metabolismo glucidico. Il GLP1 è anche uno degli stimoli precoci per la sintesi anticipatoria dell'insulina: il maggior stimolo per le cellule beta è rappresentato del glucosio, ma la masticazione, la deglutizione e il transito del chimo dal duodeno determinano la produzione di questo ormone, che determina un'iniziale produzione di insulina, in modo che quando il glucosio viene liberato nel plasma l'insulina sia già presente. Ma le incretine hanno anche altre funzioni: nel pancreas GLP1 stimola la produzione dell'insulina a scapito di quella del glucagone, inibisce l'apoptosi delle cellule beta e ne favorisce la proliferazione, aumenta la sensibilità all'insulina, in particolare nel fegato, dove inibisce la liberazione del glucosio dal glicogeno e anzi favorisce l'entrata di glucosio negli epatociti, entrata che favorisce anche negli adipociti e nel muscolo, dove ne stimola anche l'utilizzo. Ma le incretine hanno anche un effetto cardio e neuroprotettivo al livello cerebrale. Un tema degli ultimi anni è l'interazione tra microbioma e sistema nervoso centrale, l'asse stomaco (inteso come apparato digerente) - cervello: la produzione di certe molecole da parte del microbioma stimola certi processi nel SNC: il mangiar bene può quindi stimolare la produzione di ormoni neuroprotettivi, e il cibo spazzatura non ha effetti deleteri solo sulla massa grasse e sull'aspetto fisico, ma anche al livello cerebrale. Se andiamo a vedere quale può essere la funzione di questa via di segnalazione nell'intestino, dove non è associata alla percezione del sapore, possiamo supporre che la stimolazione da parte degli zuccheri moduli il rilascio delle incretine. Se prendiamo topi KO per la gusducina e confrontiamo cosa succede nella secrezione delle incretine e dell'insulina con quella di topi wt, vediamo i livelli plasmatici di GLP1 in risposta alla somministrazione di un bolo alimentare contenente zucchero (immesso nello stomaco), vediamo che nei topi wt c'è un picco dopo dieci minuti con livelli che tornano alla base dopo 30 minuti, mentre nei KO le cellule L non secernono il GLP1 al di sopra dei livelli basali, come se non sentissero l'arrivo del bolo. Lo stesso vale per GIP, anche se in questo caso un piccolo picco c'è, ma è più basso e si riporta alla base dopo più tempo. Questo vale anche per l'insulina, che ha un picco dopo 45 minuti e ridiscende alla base dopo circa 2 ore. Nei KO l'aumento è più lento e tutto sommato più drastico, e i livelli sono alti anche dopo due ore, con una diversa cinetica dell'insulinemia quindi. Questo si rispecchia sulla glicemia: dopo un quarto d'ora normalmente c'è un picco che dopo 1 ora e mezza è tornato normale, mentre la curva del carico di glucosio nel KO ha valori che restano alti più a lungo e scendono lentamente nel tempo. Se invece di fare un gavaggio di glucosio al topo facciamo mangiare dello zucchero, vediamo che la curva rimane simile a quella ottenuta con il gavaggio. Idem, i livelli di GLP1 non risentono del carico di glucosio. Se facciamo un confronto tra l'incremento nei livelli di glucosio negli animali gavati wt rispetto ai KO, vediamo che in entrambi c'è un aumento di GLP1, ma nei KO questo aumento è inferiore del 50% rispetto a quello dei topi wt. di nuovo possiamo valutare gli effetti dei recettori per il dolce in cellule intestinali in coltura. All'aumentare della concentrazione di zucchero (indipendentemente di glucosio o saccarosio) vediamo che la secrezione di GLP1 aumenta. Se però usiamo il 2 desossiglucosio questo non ha effetto, segno che il glucosio stimola questi recettori anche grazie alla presenza dell'ossidrile in posizione 2. Se invece di usare uno zucchero naturale usiamo un dolcificante come il sucralosio vediamo che aumenta la secrezione di GLP1, che non si vede più in presenza di un inibitore dei recettori, l'attisolo. Quindi la stimolazione dei recettori per il dolce in cellule L modula la produzione di incretine. Se silenziamo l'alfa gusducina riduciamo la secrezione di GLP1 in risposta al glucosio. Se vado a vedere l'espressione di una delle due subunità del recettore per il dolce, vedo che sono tanti i tessuti in cui questo è espresso: il fegato è quello in cui l'espressione è più bassa, nella lingua i livelli sono comunque massimi, ma nel rene e nel testicolo i livelli sono sovrapponibili a quelli della lingua (stiamo guardando T1R3). Lo stesso vale per i recettori per l'amaro, espressi al livello dell'intestino, che infatti vediamo marcato per l'alfa gusducina, espressa da cellule che esprimono la cromogranina. L'espressione dell'alfa gusducina nelle cellule intestinali non è generalizzata a tutti gli enterociti: ci sono due popolazioni, quelli esprimenti la villina e quelli esprimenti la cromogranina a (due ormoni), e la gusducina colocalizza solo con la cromogranina a. Vediamo anche coespressione con le cellule che esprimono il peptide Y Y, che esprimono anche GLP1 (WTF?). Il peptide Y Y media anch'esso il rilascio di insulina dal pancreas e agisce al livello cerebrale e ipotalamico, mediando alcune risposte di sazietà. Se prendiamo le cellule intestinali positive per le GLP1, PYY e la via di traduzione del segnale per il dolce, queste esprimono quasi tutte i recettori per l'amaro. Non tutti i recettori: T2R45 ha livelli bassi, ma il 13, il 49, il 4 sono espressi a livelli molto elevati. Se vediamo cosa succede se isoliamo cellule intestinali in grado di produrre peptidi come GIP, cromogranina e PYY e le stimoliamo con la PTC, vediamo un aumento del livello di calcio cellulare: la stimolazione con un sapore amaro modula l'attività secretoria di queste cellule, che necessitano di calcio per liberare le vescicole contenenti i vari ormoni. Possiamo ancora vedere che queste cellule che esprimono R38 e alfa gusducina in risposta a stimoli diversi, come la bombesina, sostanza amara che stimola R38, se esposte a bombesina hanno un picco ben definito della concentrazione di calcio (quello della PTC non era un vero e proprio picco). In queste cellule molecole gustative sono in grado di attivare tutta questa catena di eventi che in ultimo porta a un aumento della concentrazione intracellulare di calcio che determina la secrezione di incretine. Queste cellule sono quindi capaci di valutare la composizione del cibo che ingeriamo, e in funzione di questa c'è dunque una modulazione dei livelli di secrezione delle incretine, che modulano i processi secretori delle ghiandole annesse all'intestino, la proliferazione delle cellule intestinali, inducono sazietà, modulano lo svuotamento gastrico e la motilità

intestinale e attivano processi nervosi nell'apparato digerente, stimolano terminazioni vagali afferenti. Ci sono cibi che non gradiamo, ma se sono cibi che modulano la secrezione di ghiandole annesse all'intestino, non mangiarli ci priva di un effetto benefico. Andando verso il concetto di medicina personalizzata, possiamo pensare alla pasticca che contiene molecole che troviamo in cibi che non ci soddisfano per non perdere il beneficio della modulazione dell'attività secretoria. Quello che abbiamo detto per dolce e amaro vale anche per le molecole che stimolano i recettori olfattivi. Non si tratta di molecole che stanno nell'aria e sarà necessario che si solubilizzino nel cibo, ma abbiamo detto che molte molecole che sono nei cibi si liberano come volatili e stimolano i recettori olfattivi. I recettori olfattivi nel digerente modulano anch'essi l'attività secretoria degli enterociti. Se andiamo a vedere i recettori gustativi espressi in varie parti vediamo che: nel tessuto adiposo ci sono recettori putativi per gli acidi grassi a lunga (omega 3) e media catena e recettori per l'amaro. Se nel topo isoliamo gli adipociti e li stimoliamo con sostanze amare, inibiamo il differenziamento degli adipociti. Gli acidi grassi regolano invece l'adipogenesi (adipociti bianchi). Nel topo gli adipociti bruni sono responsabili della termogenesi: questo è ottimale perché permette di legare una dieta calorica (con grassi) alla stimolazione della termogenesi, che appunto si basa sul bruciare grassi per produrre calore. I recettori beta tre adrenergici sono molto presenti nel tessuto adiposo bruno (clonati solo a fine anni '80, molto dopo beta 1 e 2). Negli anni '90 furono trovati nel tessuto adiposo bruno dei roditori, e se a questi veniva somministrato un agonista dei recettori beta tre adrenergici c'era termogenesi: mangiavano ma bruciavano, e quindi non ingrassavano. C'è quindi stato un picco di lavori sulla possibilità di intervenire su questi recettori come con una pillola dimagrante, ma nell'uomo il tessuto adiposo bruno è molto ridotto, quindi si è perso interesse. Negli anni 00-10 invece si è avuto un nuovo interessamento ai recettori beta tre adrenergici nel cuore, perché sono presenti anche nel cuore e nei vasi, e hanno un effetto benefico nel recupero da un'ischemia. Ai cardiopatici si danno normalmente dei bloccanti dei beta 1 adrenergici, che sono i più rappresentati. Un bloccante di terza generazione, il nebivololo, stimola i recettori beta tre, che al livello cardiaco hanno un effetto opposto rispetto ai beta 1. Quindi il nebivololo ha un doppio effetto sui due recettori, con una duplice inibizione dell'attività cardiaca (in realtà nell'uomo è discusso l'effetto sul recettore beta 3). I recettori beta 3 hanno sul farmaco solo il milavegron, agonista che è usato in chi soffre di vescica over-attiva, perché il muscolo retrusore della vescica è contratto. I beta tre sono molto espressi nel muscolo retrusore, e ne stimolano il rilascio. Quindi un trattamento con milavegron riduce di circa il 20% il numero di volte in cui si ha lo stimolo alla minzione.

Nelle vie aeree, nella cavità seno-nasale, i recettori per il gusto aumentano la secrezione di sostanze antimicrobiche e la motilità delle ciglia e la produzione del muco. Se andiamo a vedere al livello bronchiale, i recettori per l'amaro sono presenti in varie cellule ma anche nelle cellule muscolari lisce, in cui provocano una broncodilatazione paragonabile quella dell'adrenalina. Agli asmatici vengono dati cortisonici, ma al momento dello spasmo si fa un aerosol di adrenalina, perché i recettori beta due adrenergici sono molto espressi nei bronchi. Questo però fa schizzare il bambino e, nell'adulto, causa una grossa stimolazione cardiaca potenzialmente problematica e rischiosa per un infarto (i bambini non corrono questo rischio perché hanno un cuore normalmente ben funzionante). Agonisti dei recettori per l'amaro provocano una broncodilatazione, perché fanno rilassare le cellule muscolari lisce, senza causare danni.

Al livello intestinale grelina, somatostatina, colecistochinina, GLP, GIP, PYY sono rilasciati e modulano l'attività del digerente, la glicemia e tanto altro; sono rilasciati in seguito alla stimolazione di recettori per il dolce, l'amaro e gli acidi grassi.

Se andiamo a vedere i recettori per l'olfatto espressi al di fuori dell'epitelio olfattivo, vediamo che negli adipociti stimolano la lipolisi e la termogenesi, e nelle cellule muscolari delle vie aeree determinano broncodilatazione, e al livello cardiaco hanno effetti inotropo e cronotropo negativi: mettiamo a riposo il cuore usando stimoli olfattivi. Nel rene c'è la secrezione di renina, con regolazione della pressione arteriosa, che è determinata da stimoli olfattivi. Nei testicoli, così come i recettori per il gusto sono espressi in quantità analoghe alla loro espressione nella lingua, ci sono recettori per l'olfatto che stimolano, come quelli gustativi, la chemiotassi, determinando una maggiore motilità degli spermatozoi. Si può quindi supporre che molecole del genere siano prodotte nell'apparato riproduttore femminile per determinare un maggiore successo riproduttivo.

Negli spermatozoi ci sono molecole come il burgeonale che stimolano recettori determinando un maggior movimento dello spermatozoo, invece rallentato dall'undecanale, un antagonista. Nelle arteriole renali il propionato (acido grasso: puzza) è in grado sia tramite i recettori olfattivi che tramite i recettori per gli acidi grassi di regolare la pressione arteriosa. Nella pelle stimoli olfattivi sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule epiteliali, favorendo la cicatrizzazione. Nel fegato molecole olfattive come l'acido azelaico e il carvone (avevamo detto che i recettori olfattivi sono in grado di recepire persino stereoisomeri di una stessa molecola, in questo caso meno e più carvone) porta da un lato a una riduzione della sintesi di acidi grassi, dall'altro a un'ossidazione dei grassi già presenti. Questo potrebbe essere utile nel caso della steatosi epatica: con stimoli olfattivi (ma anche gustativi visto che queste molecole sono anche nei cibi) possiamo regolare la deposizione di grassi nel fegato. Di nuovo vediamo l'esempio di burgeonale e undecanale: se facciamo un elettro olfatto gramma, vediamo che la stimolazione con burgeonale porta un aumento dei potenziali elettrici mentre una stimolazione con undecanale porta una riduzione. Se andiamo a vedere gli spermatozoi, vediamo che se usiamo burgeonale aumenta il potenziale di membrana, mentre se usiamo entrambi non succede nulla. Non si sa ancora come il recettore olfattivo trasduca il segnale nello spermatozoo, ma probabilmente è una via che ricalca quella delle cellule olfattive, perché alcuni suoi componenti sono presenti nella membrana del collo dello spermatozoo. Al livello delle cellule muscolari lisce, gli stimoli gustativi amari riducono anche il

rilascio di IgE, di molecole infiammatorie e l'attività delle cellule mononucleate ne sangue periferico, inibendo il rilascio di citochine infiammatorie. Quindi si può agire su questi recettori per intervenire su un paziente asmatico.

Retinopatie: patologie estremamente invalidanti e coprono tutto l'arco i una vita di una persona

Spesso una patologia viene definita per certi aspetti in una fase iniziale, e poi in corso d'opera vi si associano altri aspetti che modificano sensibilmente la definizione. Se andiamo a vedere su Wikipedia, nel 2011 la definizione di retinopatia era: termine generale riferito a forme di danni non infiammatori della retina, frequentemente la manifestazione di una malattia sistemica. Nel 2016: danno acuto o persistente della retina con continua infiammazione e rimodellanti vascolari. Rimodellamenti vascolari possono avvenire durante il tempo in cui il paziente non è a conoscenza della retinopatia. Ci sono retinopatie per tutte le età: la ROP è una delle cause principali di cecità nei bambini (ma pochi bambini perché regredisce), la DR colpisce diabetici in età lavorativa (circa 100 milioni nel mondo: sia di tipo 1 che di tipo 2 e quasi il 100% dei diabetici di tipo 1 hanno la retinopatia, un ratto ha problemi dopo solo un mese dall'insorgenza della malattia, lo si vede facendo un elettroretinogramma e vedendo che le cellule gangliari non funzionano bene. Ancora peggio i diabetici di tipo 2, che non scoprono per tanto tempo di avere il diabete e quindi stanno per tanto tempo senza protezione, tra l'altro se preso subito spesso non si danno nemmeno farmaci, perché basta controllare la glicemia. Queste persone spesso vanno dall'oculista, ed è lui a mandarli dal diabetologo). Prima si pensava che la DR fosse dovuta a danni al microcircolo, e si pensava quindi che il danno alle cellule gangliari fosse dovuto al danno vascolare, ma il danno alle cellule gangliari è invece precoce (storia dell'oculista che quando appoggi il mento guarda i vasi).
Infine, la maggiore causa di cecità è la degenerazione maculare legata all'età. Se dividiamo gli anziani a coorti di cinque anni vediamo che gli affetti da AMD, parkinson e alzheimer aumentano. Camilleri alla fine era cieco.

La retina è fatta a strati: il più esterno è quello dei fotorecettori, poi cellule bipolari e ganglionari che fanno il nervo ottico. La retina è il tessuto che consuma più ossigeno in proporzione al peso, perché c'è continua fototrasduzione insieme a continua rigenerazione del cis retinale. Il metabolismo retinico è molto intenso, i dischi degenerano inoltre rapidamente e la loro rigenerazione è continua e dispendiosa.
L'arteria coroidale nutre la retina, mentre gli strati interni sono nutriti dal circolo retinico. Nel nervo decorrono arteria e vena retinica, e l'arteria si dirama in arteria interna, intermedia e superficiale e innerva le cellule interne della retina. Quando i vasi formano grovigli e si estendono nel corpo vitreo si formano processi fibrosi che dal corpo vitreo vi si attaccano, creando trazione e causando il distacco della retina: certi fotorecettori si staccano e le cellule gangliari che ricevevano il segnale da quei recettori non ricevono niente, e si vedono spot neri. L'iperglicemia attiva la via dei polioli, che determina la produzione di prodotti avanzati di glicazione. Altre vie determinano la produzione di specie reattive di ossigeno e azoto, e tutte queste vie, normalmente poco rappresentate, possono determinare stress ossidativo l'attivazione di Nf k b e infiammazione. Notiamo che lo stress nitrosativo causa anch'esso stress ossidativo. Altre vie causano fibrosità e ancora infiammazione quindi. C'è un gran caos nella retina con neurodegenerazione e proliferazione dei vasi, con l'innesco dei meccanismi che determinano gli spot neri nel campo visivo.
Il problema della via dei polioli è che c'è tanto zucchero nel sangue e quindi nelle cellule retiniche. I diabetici spesso dicono di mangiare molto ma di dimagrire: le cellule insulino-dipendenti come epatociti e adipociti stanno morendo di fame in un mezzo pieno di glucosio. Però le cellule della retina sono insulino-indipendenti, perché i neuroni hanno tanti trasportatori del glucosio, e quindi si riempiono di glucosio. All'aumentare della glicemia aumenta la concentrazione intracellulare. Normalmente il glucosio che entra è subito substrato dell'esochinasi, con una Km molto bassa. L'aldoso reduttasi normalmente usa solo il 3% del glucosio cellulare, e comincia quindi a utilizzarlo quando l'esochinasi satura. La via dei polioli include due reazioni, una catalizzata dall'aldoso reduttasi (glucosio -> sorbitolo) e una catalizzata dalla sorbitolo deidrogenasi (sorbitolo -> fruttosio).

9/11

La sorbitolo deidrogenasi è l'enzima lento, quindi il sorbitolo si accumula. La aldoso reduttasi usa e quindi consuma NADPH, usato dalla glutatione reduttasi. Ci sono due meccanismi di protezione da stress ossidativo, uno basato su molecole non enzimatiche (glutatione, vitamina E) che sono delle difese antiossidanti.

Quindi se si consuma la forma ridotta del NADPH si accumula glutatione ossidato, che è comunque meno dannoso dei ROS nella cellula. La glutatione perossidasi ad esempio usa glutatione ridotto per detossificare H2O2: il glutatione ossidato viene poi ridotto con il NADPH dalla glutatione reduttasi. Una proteina ossidata modifica la sua attività: una proteina glutationilata è modificata. Questa però è una modifica reversibile della proteina che si ha in condizioni di stress ossidativo. Quando lo stress è recuperato si ripristina il potere riducente: il glutatione ridotto aumenta e reagisce con il glutatione legato alla proteina. Mettiamo in pausa l'enzima solo nel periodo di stress. Nel caso di uno stress ossidativo (o nitrosativo) pesante con ossidazione

diretta da parte dei ROS del sulfidrile di una proteina, la proteina ce la siamo giocata, dobbiamo degradarla e risintetizzarla. Per questo la forma di stress ossidativo in cui ci sono modifiche da parte del glutatione ossidato è una forma di stress migliore e reversibile.
In più il sorbitolo è osmoticamente attivo, più del glucosio: la cellula si rigonfia (edema cellulare) e ciò altera la possibilità di rilascio di neurotrasmettitore da parte dei neuroni retinici.

Anche la sorbitolo deidrogenasi crea problemi, perché sottrae NAD+ alla reazione della G3P deidrogenasi, con accumulo di G3P e produzione di prodotti di glicazione avanzata.

Nei diabetici quindi un possibile intervento è il blocco dell'aldoso reduttasi. Però non ci sono farmaci, se non uno commercializzato in Giappone, e tra l'altro l'aldoso reduttasi detossifica aldeidi tossiche che si formano sotto stress ossidativo. Il fatto è che i siti attivi sono due diversi, quindi si potrebbe pensare a inibitori differenziali.

Se dal glucosio otteniamo il fruttosio con la via dei polioli, otteniamo poi il DHP o la G3P, ottenendo dopo il metil-gliossale, una specie molto reattiva normalmente prodotta come prodotto collaterale della glicolisi. Normalmente ci sono gliossalasi che sfruttano il glutatione ridotto per eliminarlo, ma il metil-gliossale, se prodotto in massa, reagisce coni gruppi amminici dei residui di arginina, con la formazione di prodotti avanzati di glicazione. Il carbonile del glucosio stesso reagisce facilmente con i gruppi amminici di lisine e arginine a formare basi di Schiff per condensazione, con un doppio legame tra azoto e carbonio carbonilico. Questo è un doppio legame mobile che può isomerizzare dando un prodotto di Amadori con un altro carbonile che si ricrea e a sua volta può interagire con altri gruppi amminici. C'è quindi una catena di condensazioni e isomerizzazioni. Quando siamo ai prodotti di Amadori però siamo nel campo di reazioni reversibili, ma se le reazioni continuano o se interviene il metil gliossale, che reagisce con due gruppi amminici, si esce dal campo delle reazioni reversibili, con la formazione di specie radicaliche e la frammentazione di proteine e lipidi di membrana. Le specie radicaliche aumentano lo stress ossidativo, e i lipidi frammentati alterano la fluidità della membrana. Queste molecole possono anche legare dei recettori di membrana che attivano vie di stress ossidativo, produzione di TGF, fibrosi, proliferazione, Nf kb (principale TF di pathway infiammatori). E alcuni AGE stessi attivano la trascrizione di interleuchine pro infiammatorie, si inspessisce la parete dei vasi. Attivano anche le NADPH e NADH ossidasi mitocondriali, con produzione di acqua ossigenata e stress ossidativo.

La PARP (poli ADP ribosio polimerasi) in condizioni di stress ossidativo come queste (iperglicemia -> ROS) può avvenire frammentazione del DNA, che viene appunto riparata da PARP. In questo processo usa però il NAD+, sfruttando la porzione nicotinammidica e producendo ADP-ribosio, che può modificare alcune proteine. La G3P deidrogenasi viene ad esempio ADP-ribosilata nel nucleo (c'è un sistema di shuttle che la porta avanti e indietro dal nucleo). La G3P deidrogenasi è meno attiva, aumentando la concentrazione degli intermedi che possono causare la formazione di metil gliossale.

PKC ha un'ampia platea di substrati, e la sua attivazione quindi normalmente fa danni. L'iperglicemia attiva le isoforme beta e delta in particolare (ma anche alfa ed epsilon danno problemi). La PKC riduce l'espressione dell'ossido nitrico sintasi endoteliale, che è una delle tre forme di ossido nitrico sintasi (ci sono tre isoforme: endoteliale E, neurale N, inducibile I. E ed N sono normalmente costitutive). L'ossido nitrico induce vasodilatazione, e quindi la PKC aumenta la vasocostrizione. Aumenta anche la produzione di endotelina 1, che stimola l'ispessimento della parete dei vasi. Si produce anche VEGF, con angiogenesi incontrollata. I vasi che si producono non sono stabilizzati dai periciti, ma perdono. Questa produzione di VEGF è un tentativo di superare la crisi ossidativa che si ritorce sulla retina stessa, aumentando la permeabilità vascolare e determinando quindi il rilascio di mediatori infiammatori. Al livello della retina i vasi formano una barriera ematoretinica.

N.B: retina -> fuori coroide (tessuto con vasi che nutrono la retina) -> fuori sclera (connettiva). I vasi della coroide non hanno barriera, quindi le cose entrano nella coroide, ma i fotorecettori sono circondati dalle cellule dell'epitelio pigmentato, che fanno giunzioni strette. Passano e accedono ai fotorecettori solo molecole per cui ci sono trasportatori. La retina interna invece è irrorata dall'arteria retinica, che si dirama in vasi con cellule con giunzioni strette. Tutte le citochine infiammatorie e il VEGF stesso non dovrebbero passare, ma se la permeabilità della barriera è alterata dal VEGF (le proteine delle giunzioni non si salvano????) il VEGF entra nel parenchima retinico e c'è ulteriore angiogenesi con riversamento di mediatori. Aumenta anche la produzione di TGF beta, che porta una maggiore deposizione di collagene e fibronectina, proteine della matrice extracellulare con conseguente ispessimento della parete del vaso. Aumenta la produzione dell'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno. La plasmina attiva evita la formazione di coaguli di fibrina: la plasmina è quindi meno attiva, non degrada i coaguli e aumentano le occlusioni vascolari. Si attiva Nf kb che attiva i geni proinfiammatori e la PKC stimola anche la NADH ossidasi, con produzione di ROS.

Pathway dell'esosammina: il problema è la saturazione della glicolisi. Il fruttosio 6 P non smaltito reagisce in una serie di reazioni a dare glucosammina 6 fosfato coniugata a UDP. La molecola è quindi una donatrice di glucosammina, che attiva i fattori di trascrizione di geni legati allo stress, come quello di PAI1.

L'attivazione di tutte queste vie porta anche a fenomeni neurodegenerativi anche precedenti rispetto al danno vascolare. Il principale trasmettitore della retina è il glutammato: possono esserci problemi di eccitotossicità, dovuta a canali NMDA da cui entra troppo calcio, che attiva anche fenomeni apoptotici. I neuroni muoiono, aumenta la neurodegenerazione e si attivano le cellule gliali che diventano proinfiammatorie e fagocitiche (disfunzione gliale e morte neuronale). Il danno precoce quindi è rinforzato e sempre più rapido.

Le prime fasi della DR sono non proliferative, senza proliferazione dei vasi. Da lieve la DR diventa moderata e poi severa, e diventa poi così grave che come tentativo ultimo c'è l'angiogenesi, con conseguenze varie. Possiamo avere a questo punto edema maculare, causato da stravaso di liquido tra cristallino e retina (visione sfocata), e sui vasi che proliferano possono fare trazione fibre che causano il distacco della retina. All'aumento di VEGF si associa una diminuzione della produzione di fattore antiangiogenico PEDF.

Da più di dieci anni ha preso piede il concetto di unità neurovascolare: il funzionamento si basa sulla stretta relazione tra neurone, vasi e cellule endoteliali e pericitiche. Le cellule endoteliali sono unite da giunzioni strette e circondate da periciti, attorno ci sono i piedi delle cellule di Mueller, di supporto, e ci sono anche gli astrociti (cellule macrogliali) e i neuroni che prendono contatto con i neuroni. Il danno vascolare precoce ha quindi effetto sui neuroni in quest'ottica integrata, ed è questo il legame tra neurodegenerazione e danno vascolare: non sempre c'è prima l'una e poi l'altro, ma sono molto strettamente legati, e oggi ci sono cose che si possono fare per identificare il fenomeno prima di vedere il danno vascolare, che è quasi sempre un punto di non ritorno. Si fanno elettro retinogrammi, che misurano l'attività elettrica della retina, anche delle cellule di Müller. Se i neuroni iniziano a stare male prima di morire si può vedere con tomografia a coerenza ottica (OCT), che ci fa vedere lo spessore degli strati di cellule (che si riducono) o il flusso ematico. Non c'è cura ma l'oculista può suggerire diete con antiossidanti.

Sotto i 65 anni la DR è la causa maggiore di cecità.
Un'altra retinopatia è la degenerazione maculare senile. Il principale fattore di rischio è l'età, che porta prodotti di ossidazione e attività fagocitica alterata. Il danno colpisce le cellule dell'epitelio pigmentato, unite da giunzioni strette per evitare che il sangue vada direttamente alla retina. C'è accumulo di molecole di stress che fa sì che questa barriera venga meno. La degenerazione si presenta o in forma secca, con degenerazione dei recettori ma senza proliferazione dei vasi, o in forma umida, più comune, in cui c'è proliferazione dei vasi della coroide, che invadono la retina. Quindi i vasi che proliferano sono diversi da quelli che normalmente proliferano nella DR, anche se naturalmente una volta che la barriera viene meno il VEGF diffonde dappertutto e stimola l'angiogenesi anche degli altri vasi (vasi retinici). Nel caso dell'atrofia geografica il danno è prevalentemente dovuto a cellule infiammatorie che attivano il complemento e determinano la degenerazione dei fotorecettori, mentre nella forma umida la cecità è data dal distacco.

ROP
La vascolarizzazione della retina si completa a 39 settimane (un bambino nasce con retina ok). Un prematuro nasce con vascolarizzazione incompleta, ma si trova in un ambiente così ricco di ossigeno che la crescita dei vasi si arresta e addirittura c'è regressione (a maggior ragione se il bambino è messo in incubatrice). Anche la retina però cresce e arriva il momento in cui le cellule della retina sono in ipossia e come cellule tumorali secernono VEGF: se la proliferazione e il richiamo dei vasi sono troppo tumultuosi c'è angiogenesi incontrollata e ci sono problemi. Nella maggior parte dei casi la malattia regredisce da sola, ma ci sono casi in cui invece è necessario intervenire, perché il rischio è che i corpi fibrosi si aggancino ai grovigli dei vasi facendo trazione e causando il distacco della retina. Quindi tutte e tre queste patologie sono dovute a neovascolarizzazione per angiogenesi (formazione di vasi a partire da vasi preesistenti, diversa dalla vasculogenesi, che avviene prevalentemente nello sviluppo a partire da precursori cellulari delle cellule endoteliali). L'angiogenesi è anche bilanciata e fisiologica, necessaria per riparare le ferite o per riparare l'endometrio. Ci sono altre malattie, come cancro e artrite reumatoide, dovute ad eccessiva angiogenesi, ma problemi cardiaci (esigenza di nuovi vasi che vascolarizzino dopo un'ischemia lo spessore del miocardio) e infertilità (endometrio poco irrorato) sono spesso causati da insufficiente angiogenesi.

16/11

L'utilizzo di precursori endoteliali si pensava possibile per risolvere ischemia degli stessi pazienti cardiopatici. Ma ci sono due problemi: innanzitutto è difficile isolare i precursori, e in secondo luogo se nel frattempo il paziente ha un tumore ancora non ben sviluppato, le cellule endoteliali fanno angiogenesi.

Cellule endoteliali lisce che poggiano su una lamina basale. Quando è prodotto VEGF (v e g f) le cellule emettono pseudopodi, e poi attraverso un processo di vacuolizzazione si forma il vaso.

Cornea del topo in cui è fatta una lesione: dopo la lesione vasi piccoli sottili e tanti, tipici dell'angiogenesi.

HIF regola la trascrizione di migliaia di geni. Si attiva non solo in condizioni di ipossia patologica, ma anche in montagna a basse pressioni parziali dell'ossigeno. La subunità alfa è continuamente prodotta e degradata, questo dimostra l'importanza del corretto funzionamento, molto energeticamente demanding, per la fisiologia della cellula. Si parla di proteina VHL (vu h l), che ubiquitina la subunità alfa: stiamo parlando di poliubiquitinazione, che appunto porta alla degradazione (la mono ub modula l'attività e basta).

HRE in migliaia di geni

Lui dice glut-one: la cellula tumorale ha bisogno di glucosio per l'effetto warburg (shift metabolico). Anche gli enzimi della glicolisi sono upregolati da HIF. Nell'immagine vediamo l'inizio dello sviluppo della vascolarizzazione della retina, e vediamo le tip cells con gli pseudopodi. I vasi sono pervi, e quindi potenzialmente pericolosi.

Le forme lunghe del VEGF sono legate alla matrice: quando le MMP agiscono lo liberano
VEGF A principale
VEGF B ha anche isoforme anti angiogeniche (6 x)

A e B prevalentemente prodotti dal tumore

VEGF E gliale o virale(??????????)
VEGF F nel veleno dei serpenti

PLGF 1 e 2 placental growth factors: sono isoforme di VEGF

Esistono tre diversi recettori per il VEGF (VEGFR1,2,3): 1 e 2 sono ad attività tirosin chinasica e mediano vasculogenesi e angiogenesi, e il 2 è quello maggiormente coinvolto nell'angiogenesi patologica. VEGFR1 è di membrana, ma viene anche tagliato: finisce in giro.
In condizioni fisiologiche VEGF A è legato prevalentemente all'1, sia solubile che di membrana, che stimola l'angiogenesi solo a un livello basale. Solo quando VEGF ha un'elevata concentrazione si lega anche a VEGFR2, che ha meno affinità ma è troppo forte. VEGF3 è coinvolto nella formazione dei vasi linfatici. Tutto il sistema è ulteriormente potenziato dalla presenza di corecettori, le neuropiline. La neuropilina 1 stimola l'angiogenesi dei vasi linfatici. I recettori arrivano alla massima attività quando si legano alle neuropiline. I recettori 1 e 2 legano NRP1 e il recettore 3 lega NRP3. Chiaramente quando VEGFR1 è staccato dalla membrana agisce da tampone, sequestrando il VEGF, cosa che è alla base di farmaci anti-VEGF.
VEGFR1 e 2 sono legati da VEGF A. B lega solo 1, E lega solo 2.
Le vie attivate sono tantissime, portano alla maggiore permeabilizzazione (sintesi prostaglandine) dei vasi e alla loro proliferazione incontrollata. Ci sono anche altri fattori di crescita che stimolano la proliferazione basale.
Circa 800 milioni di persone nel mondo soffrono di retinopatia diabetica (adesso diffusa anche nei paesi in via di sviluppo, che prima la conoscevano poco e adesso hanno sempre più cibo spazzatura: basta vedere delle foto di classe cinesi di oggi e di cinquant'anni fa, oggi tutti hanno gli occhiali), o di AMD (anche questa ormai più diffusa per l'aumento della longevità). Il diabetico va anche dall'oculista, se la retinopatia non è proliferativa non si fa nulla, mentre si interviene se è proliferativa o se diventa grave ma non ancora proliferativa (in questo caso sta all'esperienza di oculista e diabetologo). Fino a pochi anni fa si faceva una fotocoagulazione laser. Nella retinopatia proliferativa si formano sulla retina grovigli di vasi che si vanno a bruciare: il fatto è che ce ne possono essere anche centinaia, il che richiede una bruciatura massiccia, e se tutto va bene si vede un po' meglio (ma solo un po': troppe cicatrici), e soprattutto non si affrontano le cause. Dal 2004 c'è il primo antiVEGF. Nel 2010 gli antiVEGF prendono la copertina di Science, eletti farmaco dell'anno. Nel 2008 è stato avviato uno studio in Danimarca (5 milioni di abitanti) di antiVEGF su diabetici con retinopatia proliferativa: in pochi anni il numero di pazienti è dimezzato. Il primo farmaco introdotto contro l'AMD e l'edema maculare diabetico (complicanza della DR proliferativa) è la porzione Fab di un anticorpo prodotto nel topo per riconoscere tutte le forme del VEGF umano. Usiamo circa 50 kDa invece dei circa 150

dell'anticorpo completo. Si usa anche in contesti diversi da quelli per cui è stato approvato: non c'è un'approvazione specifica per DR e ROP, ma si può decidere di usarlo. Questo è il Ranibizumab, commerciato dalla Novartis come Lucentis.
Un concorrente approvato come antitumorale è l'anticorpo intero Bevacizumab, Avastin. Sono stati entrambi sviluppati dal catanese Ferrara in California. Roche prima compra la sua azienda per acquisire i diritti sul farmaco. Il farmaco è iniettato per iniezione vitreale. Ma una proteina da 150 kDa diffonde male in un sistema non perfettamente liquido, quindi Ferrara disegna poi il Ranibizumab, comprato da Novartis. In molti lavori si mostra che per l'applicazione oculare hanno lo stesso effetto, ma Avastin costa 100 euro a iniezione, mentre Lucentis 1600 euro a iniezione. Roche e Novartis sono state accusate di aver fatto cartello, accordandosi con gli oculisti perché venisse prescritto Lucentis, che è un salasso per il sistema sanitario. Si fa un'applicazione mensile per circa tre mesi e poi ci si rivede ogni tre mesi valutando nuovi cicli bimestrali.
Pegaptanib (commercializzato Macugen) è stato il primo anti-VEGF, approvato per la degenarazione maculare senile; è stato sviluppato come aptamero, farmaco a RNA con sequenze leganti il VEGF. L'aptamero di per sé è piccolo, ma lo si coniuga a sequenze proteiche lunghe, che lo rendono meno diffusibile. Un farmaco che invece si usa ancora è l'Afilbercept (commercializzato Eylea), che ha una struttura similanticorpale in cui sono ingegnerizzate le regioni di legame di R1 e R2.
L'anno scorso è stato introdotto il Brocizumab, basato su piccole sequenze leganti il VEGF. Approvato per la AMD umida, ma dopo una fase iniziale di tre mesi si va a inieizioni più dilatate. L'anno scorso invece è stato basato un farmaco basato su un principio non di ab monoclonale, ma basato su DARPIN (ripetizioni di anchirina) di 15 kDa. Il problema è un 20% di infiammazione intraoculare nei pazienti. Il principio è intelligente, e probablimente non è finita qui. Ci sono delle limitazioni:
il paziente deve farsi delle iniezioni intraoculari, con possibili effetti collaterali e in generale sedute poco piacevoli
il paziente è quasi sempre in fase avanzata, con vascolarizzazione già in atto. Ci sono altri fattori che stimolano l'angiogenesi
Un'altra cosa sono i rebound: a volte la patologia riparte dopo la terapia ed è più difficile arrestarla
Ultima limitazione, quantomeno teorica. Il VEGF è un fattore anche neuroprotettivo. Quindi togliendolo tutto mettiamo in pericolo la circuiteria retinica. Nel topo ci sono danni (lavoro del 2007? 2017?), nell'uomo questo non si è visto, forse perché ancora non si usano da abbastanza questi farmaci, e forse anche perché si usa su anziani che muoiono prima dell'insorgenza di complicazioni. Se si sottopone la retina di topo a un'ischemia di perfusione (si lega l'arteria retinica e la si slega), al momento dello slegamento, cioè della riperfusione, si ha morte cellulare. Un marcatore di morte è il tanel, e vediamo che colocalizza con il marcatore neuronale (VEDI SLIDE E APPUNTI). In questo modello la somministrazione di VEGF sia A (164 aa) che 120 aa si riduce il numero di cellule apoptotiche. Quindi il VEGF garantisce neuroprotezione e il mantenimento di una corretta vascolarizzazione. Il problema è aperto.

Parliamo della retinopatia del prematuro.

La somministrazione vitreale di anti-VEGF non va bene in un bambino nato prematuro, non solo per le modalità ma anche per questi possibili effetti. La ROP correla molto bene con l'età gestazionale e il peso alla nascita, è comune in bambini che nascono sotto i 1200 grammi, e in molti casi regredisce spontaneamente. Agli inizi del 900 i bambini morivano, ha delle ondate. La prima ondata, quando veniva chiamata retinal displasia, fu alla fine della seconda guerra mondiale, quando i bambini prematuri cominciarono a essere salvati. Poi boom economico e adesso siamo nella terza ondata (da 5-10 anni sudamerica e asia spendono nel trattamento dei prematuri grazie all'economioa che cresce). Addirittura c'è un'ondata di ROP aggressiva posteriore. La patologia ha una stadiazione precisa, passando da stadi meno gravi a più gravi. Questa retinopatia posteriore aggressiva salta gli stadi (1->4,5), con possibile cecità. A parte in questi casi, il decorso della patologia è abbastanza prevedibile. La patologia comincia fra la 32-33esima settimana di età gestazionale (quindi in certi casi di nascita molto prematura anche dopo la nascita). anche i bambini che però hanno superato la ROP poi tendono ad avere problemi oculistici.
0) non c'è ROP

1. si forma una linea di demarcazione tra la zona centrale vascolarizzata della retina e la regione non vascolarizzata, tanto più estesa quanto più è prematuro
2. la linea diventa più spessa e si solleva rispetto alla retina. Alcuni vasi diventano più corposi, è il cosiddetto stadio 2 plus, da cui si può decidere di intervenire
3. si formano vasi da angiogenesi
4. si ha il parziale distacco (cecità parziale)
5. totale distacco retinico (cecità totale)

Il bambino esce dall'utero e passa da ipossia a iperossia (a maggior ragione se è in incubatrice, con una pressione parziale del 90%). Quindi se la vascolarizzazione non era stata completata, non viene completata in questa fase perché non viene sintetizzato VEGF in ipossia e quindi non vengono richiamati vasi, anzi i vasi più piccoli tendono a chiudersi e le cellule endoteliali vanno in apoptosi. Il bambino poi cresce e anche la retina cresce, finché la porzione più esterna non va in ipossia, con la dimerizzazione di HIF e la stimolazione massiva della crescita dei vasi, che crescono anche al di fuori del piano della retina. A questo punto si può risolvere la ROP, oppure la malattia può progredire. IGF è un altro fattore proangiogenico che affianca VEGF (ma lo hanno lasciato perdere).

Il propanololo è usato per problemi cardiaci e per gli emangiomi infantili, il più comune tumore benigno infantile: 5-10% dei bambini e circa un terzo dei nati prematuri. Forme più gravi di emangiomi (foto del bambino con l'occhio chiuso dall'emangioma) regrediscono comunque spontaneamente, ma si deve intervenire, anche perché possono essere non solo cutanei, ma anche negli organi interni. Hanno una fase proliferativa rapida, si stabilizzano e poi regrediscono, ma anche in tanto tempo (anni). Fino a poco tempo fa c'erano pochi trattamenti con grossi effetti collaterali: chirurgia o cortisone con antitumorali, difficili da usare su un bambino. Per pura serendipità nel 2008 un gruppo francese tratta un bambino con emangioma che colpisce occhio e orecchio (quindi ci sono problemi funzionali) con cortisonici. Il bambino ad un certo punto ha un problema cardiologico e i medici usano il propanololo. Dalla sera alla mattina l'emangioma si è decolorato, e cominciano a somministrarlo, interrompendo poi i cortisonici. A sette mesi il bambino ha un emangioma quasi del tutto regredito, solo esterno e quindi solo estetico. Smettono di usare il propanololo e cominciano a vedere che comunque l'emangioma se ne va. Dal 2009 il propanololo è il gold standard per gli emangiomi infantili: è stato ampliato il novero delle malattie per cui si usa.
Il propanololo è un beta bloccante, inventato nel 73 da Black, che prese il premio Nobel. Si usa per problemi cardiaci anche in bambini e costa poco.

2020

Alzheimer: età, meno del 10% precoci e genetici, importante perché l'età media aumenta. Ogni anni raddoppia la probabilità di insorgenza (coorti di cinque anni: x, 2x, 4x…): si stima che nel 2050 13 milioni di americani avranno AD se non si trova un trattamento. Grosso costo sia emotivo che economico: nelle fasi precoci assistenza domiciliare, nelle fasi avanzate in residenza assistita o a casa con infermiere/badanti: negli USA 10^11 dollari l'anno. Il grosso delle demenze è di origine vascolare: ridotto apporto al cervello -> demenza. Una demenza è dura da definire in modo stretto (vascolare o parkinson o AD), perché quasi sempre i quadri si sovrappongono. Oggi tecniche di imaging funzionali per diagnosi presuntive mirate: si sovrappone una risonanza con una PET per vedere atrofia della corteccia e riduzione dell'attività neuronale con aumento di ampiezza dei ventricoli e regressioni della corteccia.
Fattori di rischio: età, sesso, allele epsilon 4 della apolipoproteina E (il rischio di sviluppare AD nella vita 9 -> 29% L'allele non dà la certezza, ma è un indizio, il neurologo ordina di fare anche le analisi), alti livelli di omocisteina plasmatica (in generale di problemi neurali), bassi livelli di B12 e folato,

7/12

Elevata incidenza di parkinson in una compagnia di operai che lavoravano negli USA negli anni '50 con metalli pesanti.
Anche problemi cardiaci possono essere alla base dell'AD
Ibuprofene e antinfiammatori sono utili per rallentare la patologia. Tuti gli interventi che si fanno sono per tamponare la patologia. I primi tre farmaci che si danno sono tre inibitori delle colinesterasi: l'AD causa carenza dei neuroni colinergici. In più ci sono disfunzioni dei neuroni glutammatergici, quindi un inibitore della trasmissione glutammatergica è usato per evitare fenomeni di eccitotossicità.
Nell'AD familiare c'è il coinvolgimento di geni codificanti per l'APP e gli enzimi del suo metabolismo, quindi sulla carta questa via sarebbe bersagliabile, ma in realtà ci sono scarsi risultati. Il peptide amiloide beta a certe concentrazioni va bene, ha un ruolo fisiologico: c'è un filone che studia quale sia il punto di inversione di questi effetti. Naturalmente il peptide amiloide beta causa infiammazione in aggregati, per questo si usano gli anti infiammatori.
L'aggregazione richiede zinco e rame, ma questi sono cofattori di tanti altri enzimi, come i ZnF TF e la superossido dismutasi.
Sono più di vent'anni che si tentano strategie vaccinali.
Un anticorpo monoclonale (aducanumab) dovrebbe prevenire la formazione delle placche bloccando il peptide amiloide beta prima che si formino le placche. Questo farmaco è salito alla ribalta due anni fa, e potrebbe limitare l'insorgenza dell'AD. Questo farmaco è stato studiato fino al 2019, anno in cui si sono interrotti gli studi perché non c'erano risultati sufficientemente positivi. Solo in seguito si sono ripresi i dati e nel 2021 c'è stata una rapida approvazione dell'aducanumab. Questa approvazione è stata molto pubblicizzata, ma più per una questione mediatica di supporto alle tecnologie scientifiche e alla terapia con anticorpi monoclonali in un periodo di scetticismo da pandemia. C'è riduzione di proteina tau.

C'è grande interesse per marcatori (se scrivi AD markers su pubmed c'è di tutto): Tau fosforilata ma anche non, livelli di GFAP (proteina degli astrociti fagocitici) in liquor e plasma, citochine, marcatori di stress ossidativo, beta amiloide. L'NIH ha detto quali sono i criteri di un marcatore ideale: evidenziale pre-mortem, correlato alle condizioni patologiche, specifico, rilevabile con tecniche standard e trasferibili dal lab alla clinica, individuato da almeno due gruppi di ricerca, le tecniche di rilevazione devono essere facili e trasferibili nelle nazioni meno sviluppate, rilevabile in fasi precoci e modificabile da interventi terapeutici: non posso introdurre un biomarcatore che soppianti la risonanza a meno che il marcatore non dia un'accuratezza nella diagnosi

che è superiore. Parallelamente, all'inizio quello che si cerca è la safety di un farmaco, poi quello che si vede è se il farmaco ha un effetto migliore di altri farmaci, riprendendo pazienti che ad esempio sono ormai insensibili ad altri trattamenti.
Dobbiamo poter valutare il biomarcatore su campioni facilmente ottenibili. Ci sono livelli di beta amiloide nel liquor, ma il prelievo del liquor richiede personale competente e ospedalizzazione. In ambulatorio si fa invece il prelievo plasmatico. Alcuni biomarcatori plasmatici sono livelli aumentati della beta amiloide, che invece diminuiscono quando lo stadio è avanzato (perché si formano le placche, il che riflette il ruolo di tampone delle placche). Bassi livelli plasmatici di peptide non tossico sono associati al rischio della malattia. Un lavoro proposto da ricercatori giapponesi cerca di misurare il livello di peptide amiloide beta usando dei modificatori che ne esaltino la presenza. Si tratta di infondere un modificatore che lega il peptide e ne favorisce la rilevazione.

Oltre al plasma ci sono altri distretti in cui identificare il peptide amiloide beta. L'APP è espressa e processata anche nelle piastrine, quindi si può vedere il suo livello nelle piastrine. Anche perché le piastrine si possono tenere in coltura. Tra l'altro l'APP esiste in due forme, una a 130 e una a 110 kDa, e il rapporto trea queste due forme diminuisce con il progredire della malattia da uno stadio mild a uno stadio avanzato. Altri msrcstori piastrinici possibiloi sono gli enzimi coinvoplti nel processamento dell'APP. ADAM10 è del complesso dell'alfa secretasi, e i suoi livelli diminuiscono con il progredire della malattia, con un aumento parallelo dell'attività beta secretasica (non c'è correlazione qui però con lo stadio). Possiamo vedere il peptide amiloide beta anche nella saliva. Tuttavia non sembra esserci nemmeno in questo caso una correlazione tra i livelli di beta amiloide nella saliva e staduio della malattia, valutato come punteggio al MMSE.

Nel 2004 i ratti KO erano assenti dalla ricerca; ovviamente all'epoca le tecniche di gene editing non erano state sviluppate come adesso. Le zone e i tempi in cui si sviluppano le placche nel topo sono simili a quelli umani, e possiamo fare test comportamentali per valutare l'effetto del transgene e anche strategie terapeutiche. Non possiamo fare test per 40 molecole sui topi per uno screening generalizzato di curve dose risposta: facciamo prima test in silico e poi test in vitro con una preselezione delle molecole. Produrre animali transgenici richiede tempo, e dobbiamo farli invecchiare prima di ottenere risultati sull'AD: il topo è quindi un modello lento e costoso, che però mostra il ruolo dei geni mutati nell'AD familiare nell'eziopatogenesi della malattia. Possiamo vedere il ruolo del colesterolo e dei fenomeni infiammatori, e anche vedere nel cervello che succede quando si fa un trattamento.

Lampreda: molto diversa, ma vediamo cosa succede quando abbiamo la mutazione di geni mutati nell'uomo. C'è però un impatto etico che svanisce totalmente per C. elegans, che pure lui ha tutto diverso ma ha tutte vie note ed è un modello molto consolidato. In drosophila possiamo fare pure studi comportamentali come quelli fatti per le OBP. La stadiazione e la localizzazione di placche senili e lesioni dei topi e delle mosche mutanti correlano bene con quelle degli umani.

Nel morris watermaze l'acqua è opacizzata e il topo la prima volta trova la piattaforma casualmente. Fuori dalla vasca ci sono elementi che permettono al topo di riorientarsi, se non è il transgenico che ha l'AD, il giorno successivo.

Il radial arm maze sfrutta la curiosità del topo: il topo con AD si muove in modo caotico quando esplora. Lo stesso vale nell'object recognition test.

Vediamo ora uno die primi lavori pubblicati sull'immunizzazione vaccinale contro il peptide beta amiloide mutato di una forma di AD familiare.
AA sei settimane si comincia l'immunizzazione: topi non trattati, topi trattati solo con PBS, topi con transgene giusto e topi con peptide sc(?????), di 42 aa permutati. Si sacrificano i topi e quelli immunizzati non hanno le placche senili nonostante fossero destinati a svilupparli. Questo trattamento non è solo preventivo, ma anche curativo, perché permette di fare regredire la malattia in animali più vecchi di 11 mesi. A 18 mesi l'animale immunizzato ha meno placche di quelle che aveva all'inizio. Questa immunizzazione ha quindi anche un valore terapeutico. Nei primi anni 2000 si è fatto lo studio sull'uomo, ma c'è stata infiammazione, così come in tutti gli altri studi equivalenti.